

AUS DEM INSTITUT FÜR IMMUNOLOGIE

ARBEITSGRUPPE KLINISCHE IMMUNOLOGIE

LEITUNG: PROF. DR. RER. NAT. B. MÜLLER-HILKE, MME

**EINFLUSS EINER DURCH**  
***PORPHYROMONAS GINGIVALIS, FUSOBACTERIUM NUCLEATUM UND***  
***AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* AUSGELOSTEN**  
**PARODONTITIS AUF DIE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS**

EINE TIEREXPERIMENTELLE STUDIE

INAUGURALDISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES  
**DOKTOR DER MEDIZIN**  
DER  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON:

MEINOLF NIKOLAS BERNHARD EBBERS, GEB. AM 01.06.1988 IN NORDHORN  
AUS ROSTOCK

ROSTOCK, DEN 14.10.2018

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0148-0

---

Veröffentlichung der Dissertation:

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock in folgender Publikation veröffentlicht:

**Ebbers M**, Lübcke PM, Volzke J, Kriebel K, Hieke C, Engelmann R, et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Sci Rep.* 2018 Dec 11;8(1):15129.

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, MME  
AG Klinische Immunologie, Institut für Immunologie  
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer  
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Alexander Scheffold  
Institut für Immunologie  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

Datum der Abgabe: 12.01.2018

Datum der Verteidigung: 18.09.2018

---

---

---

*parentibus et fratri*



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>II. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
2.1 Rheumatoide Arthritis .....	8
2.2 Parodontitis .....	10
2.3 Zielsetzung dieser Studie und Tiermodelle .....	14
<b>III. Material .....</b>	<b>16</b>
3.1 Verbrauchsmaterialien .....	16
3.2 Chemikalien .....	17
3.3 Geräte .....	17
3.4 Versuchstiere .....	18
3.5 Software .....	18
<b>IV. Methoden .....</b>	<b>19</b>
4.1 Versuchstiere und Tierhaltung .....	19
4.2 Bakterienzucht und - aufbereitung .....	19
4.3 Anästhesie der Versuchstiere .....	20
4.4 Induktion der Parodontitis .....	21
4.5 Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) .....	21
4.6 Kontrolle des Körpergewichts .....	22
4.7 Verlaufskontrolle der Kollagen-induzierten Arthritis .....	23
4.8 Quantifizierung der Parodontitis .....	23
4.9 Histologische Aufarbeitung .....	25
4.10 Blutanalyse .....	26
4.11 statistische Analyse .....	28

---

<b>V. Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
5.1 Studiendesign.....	29
5.2 Monitoring der eingefrorenen Bakterien .....	32
5.3 Protokoll zur mikrocomputertomographischen Quantifizierung einer PD.....	34
5.4 Quantifizierung der Parodontitis im Vorexperiment.....	38
5.5 Analyse der Antikörpertiter gegen <i>P. gingivalis</i> im Vorexperiment.....	39
5.6 Quantifizierung der Parodontitis im Hauptexperiment .....	40
5.7 Quantifizierung der Kollagen-induzierte Arthritis .....	41
5.8 Körpergewicht.....	44
5.9 Histologische Auswertung.....	45
5.10 Analyse der antibakteriellen Antikörpertiter im Hauptexperiment.....	46
5.11 Analyse der Antikörper gegen bovines und murines Kollagen Typ II .....	49
5.12 Analyse der inflammatorischen Zytokine.....	51
5.13 Analyse der Antikörper gegen cyclische citrullinierte Proteine (anti-CCP).....	53
<b>VI. Diskussion.....</b>	<b>55</b>
<b>VII. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>VIII. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>69</b>
<b>IX. Lebenslauf.....</b>	<b>70</b>
<b>X. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>XI. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>XII. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>XIII. Thesen .....</b>	<b>77</b>

---

## I. ZUSAMMENFASSUNG

---

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunerkrankung der Gelenke, die in schweren Fällen das gesamte System in Mitleidenschaft zieht. Obwohl die genaue Pathogenese der RA bis heute nicht aufgeklärt ist, legt die Häufung von schwerer Parodontitis (PD) bei RA Patienten einen Zusammenhang beider Erkrankungen nahe. Als Verbindung wird derzeit das Parodontitis-typische Bakterium *Porphyromonas gingivalis* vermutet, das durch seine besondere enzymatische Ausstattung sowohl körpereigene als auch bakterielle Proteine citrullinieren kann. Gegen diese citrullinierten Peptidantigene bilden RA Patienten Antikörper, sogenannte ACPA, die bis zu 14 Jahre vor Ausbruch der Erkrankung nachgewiesen werden können. Ziel dieser Studie war es zunächst, ein zuverlässiges Parodontitis-Modell in der Maus zu etablieren. Hierzu wurde zunächst die Empfänglichkeit von verschiedenen Mausstämmen hinsichtlich der Entwicklung einer Parodontitis durch orale Inokulationen mit *P. gingivalis* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass DBA/1J Mäuse nahezu resistent gegenüber einer oralen Infektion mit *P. gingivalis* waren und Tiere des SKG-Stammes nur minimale Symptome einer PD aufwiesen. F1 Tiere (DBA/1J x B10.Q) hingegen zeigten den schwersten Verlust an Alveolarknochen. Da im Menschen eine Parodontitis niemals mit nur einer Bakterienspezies vergesellschaftet ist, wurde in unserem Hauptexperiment der Einfluss von drei Parodontitis-typischen Bakterien (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) sowohl auf die Parodontitis in F1 Mäusen als auch auf die nachfolgend ausgelöste Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) untersucht. Dabei wurde überraschenderweise beobachtet, dass *P. gingivalis* zwar die schwerste PD hervorrief, eine durch die Dreierkombination der Bakterien ausgelöste PD jedoch signifikant weniger Verlust des Alveolarknochens bedingte. Unabhängig davon, ob die PD durch ein einziges Bakterium oder durch die Dreierkombination ausgelöst wurde, zeigten sich beim Schweregrad der Arthritis keine Unterschiede. Allerdings wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich des Beginns und der Progression der CIA festgestellt. So zeigte sich auch hier der langsamste Anstieg der Inzidenz in der Versuchstiergruppe, die mit der Dreierkombination inokuliert wurde. Der schnellste Inzidenzanstieg war nach Inokulation mit *F. nucleatum* oder *A. actinomycetemcomitans* zu verzeichnen. Analysen von Serumantikörpern gegen murines und bovines Kollagen Typ 2 sowie gegen zyklisches citrulliniertes Protein (anti-CCP) zeigten keine gruppenspezifischen Unterschiede. Und obwohl die durchflusszytometrische Analyse inflammatorischer Zytokine am Ende des Versuchszeitraums keinen Rückschluss mehr auf eine bakterienspezifische Manipulation der murinen Immunantwort bot, zeigt die vorliegende Arbeit dennoch einen signifikanten Einfluss unterschiedlicher Parodontitis-typischer Bakterien auf den alveolären Knochenverlust, sowie auf den Entwicklungszeitpunkt und die Progression der experimentellen Arthritis.

## **II. EINLEITUNG**

---

### **2.1 RHEUMATOIDE ARTHRITIS**

---

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine autoimmunbedingte chronisch-entzündliche Multisystemerkrankung, die primär zur Destruktion der Gelenke und gelenknahen Knochen führt (1–3). Es können auch extraartikuläre Strukturen betroffen sein (1). Hierzu gehören unter anderem das Gefäßsystem, das Herz, die Augen, der Gastrointestinaltrakt, die Lunge, die Niere und das Nervensystem (4). Unbehandelt führt eine hohe Krankheitsaktivität zu einer starken Einschränkung der Mobilität bis hin zu einem vollständigen Funktionsverlust der betroffenen Gelenke und Strukturen, sowie zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität (5). Die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis beträgt schätzungsweise 0,5 - 1% in Nordamerika und Europa. Mit zunehmenden Alter steigt das Risiko, an einer RA zu erkranken. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (6). Sowohl im Hinblick auf direkte medizinische Kosten, als auch hinsichtlich der Konsequenzen der Mobilitätseinschränkungen bei aktiver Krankheit im Sinne von verminderter Produktivität und reduzierter Teilnahme am sozialen Leben, besitzt die rheumatoide Arthritis eine hohe sozioökonomische Relevanz (7). Trotz intensiver Bemühungen ist eine definitive Heilung bis heute nicht möglich. Das liegt unter anderem daran, dass der zur Entstehung führende Mechanismus bis heute unbekannt ist. Ein eingehendes Verständnis der Pathogenese und die Identifikation des auslösenden Agens ist jedoch für eine effektive Therapie, Heilung und Prophylaxe essenziell (3,8). In der Vergangenheit erfolgte die Behandlung der rheumatoiden Arthritis anhand eines Therapieschemas in Form einer Pyramide. Das Konzept bestand dabei aus einer der Krankheitsaktivität-angepassten medikamentösen Therapie, deren Basis Bettruhe und die Gabe von Analgetika darstellten. Bei Bedarf erfolgte dann, sofern die Basistherapie nicht ausreichende Effekte erzielte, die Therapieeskalation mit Immunsuppressiva (8,9). Entscheidender Nachteil dieses Konzeptes war es, dass die eingeleitete Basistherapie häufig keinen Effekt bei den Patienten zeigte und es vergleichsweise lange gedauert hat, bis man in der Therapiepyramide an einer Ebene angekommen war, an der Medikamente eingesetzt wurden, die den gewünschten Effekt zeigten (9,10). Im Laufe der Zeit änderte sich die Behandlung der RA grundlegend im Sinne eines Paradigmenwechsels (11). Die heutige Therapie der rheumatoiden Arthritis erfolgt anhand eines strategischen Ansatzes, infolge dessen zuerst die Krankheitsaktivität analysiert wird und je nach Schwere mit entzündungshemmenden Medikamenten schnell, ausreichend und direkt therapiert wird (12). Das entwickelte Konzept des „hit hard and early“ beschreibt dabei die möglichst frühzeitige und ausreichende Immunsuppression, um eine Remission zu erzielen. Übergeordnetes Ziel ist es, einen Gelenkschaden und Schäden an anderen Organen zu vermeiden (13–15).

Sollte dies aufgrund der hohen Krankheitsaktivität nicht möglich sein, ist das nachrangige Ziel die Reduktion der Krankheitsaktivität (8). Eine Schlüsselrolle in der Behandlung von Patienten mit rheumatoider Arthritis ist daher die frühzeitige Diagnosestellung, sowie nachfolgend ein frühzeitiger und effektiver medikamentöser Therapiebeginn, um ein rasches Fortschreiten der Krankheit bereits im frühen Krankheitsstadium zu unterbinden oder zumindest zu bremsen. Eine frühzeitige und effektive Reduktion der Entzündungsreaktion führt nicht nur zu einer raschen Symptomlinderung, sondern es verhindert auch prophylaktisch zukünftigen Entzündungsschübe und Funktionseinschränkungen (15). Hierzu konnten deutliche Fortschritten in der medikamentösen Therapie gemacht werden, die zu einer schnellen Eindämmung der Krankheitsaktivität und so zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten geführt haben. Es lassen sich die heute am häufigsten eingesetzten Medikamente in zwei Gruppen einteilen. Zu Nennen sind hier die Disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDS), wie beispielsweise Methotrexat und die Biologicals, wie beispielsweise Adalimumab und Infliximab (12). Vergleichsweise neu in der Therapie der RA und auch erst seit kurzem zugelassen, sind die sogenannten Janus-Kinase-Inhibitoren Tofacitinib und Baricitinib (8). Alle genannten Medikamente dienen jedoch nur der symptomatischen Therapie. Um eine effektive Prophylaxe zu betreiben, ist das Verständnis des auslösenden Agens von entscheidender Bedeutung (1,5,8).

Bei der Erforschung des auslösenden Mechanismus konnten diverse Risikofaktoren für die Entwicklung der Erkrankung identifiziert werden. Diese Faktoren lassen sich in modifizierbare und nicht-modifizierbare Risikofaktoren einteilen. Ein Beispiel für einen modifizierbaren Risikofaktor stellt das Rauchen dar. Der inhalative Nikotinkonsum durch Zigaretten gilt als einer der wohl wichtigsten zu beeinflussenden Faktoren für die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis (16). Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass das Risiko für die Entwicklung einer RA bei Rauchern etwa doppelt so hoch ist wie bei Nichtrauchern (17). Dabei scheint es einen Zusammenhang zwischen der Menge der konsumierten Zigaretten und dem Risiko an der RA zu erkranken zu geben (18,19). Ein weiterer modifizierbarer Risikofaktor für die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis stellt Übergewicht dar. So konnte gezeigt werden, dass die Chance zu erkranken bei Menschen die übergewichtig oder adipös sind, erhöht ist im Vergleich zu Normalgewichtigen (20,21). Interessanterweise scheinen übergewichtige Menschen, die bereits an einer RA leiden, an einem deutlich schwereren Verlauf zu erkranken als normalgewichtige Patienten (22). Zu den nicht-modifizierbaren Risikofaktoren zählen unter anderem das Geschlecht und eine gewisse genetische Prädisposition. Es gilt als bewiesen, dass Frauen häufiger an einer rheumatoiden Arthritis erkranken als Männer (23). Dabei wird ein hormoneller Einfluss als mögliche Ursache diskutiert. So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sich

die Einnahme von oralen Kontrazeptiva möglicherweise protektiv auswirkt (24). Ein weiterer bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung einer RA stellt eine gewisse genetische Risikokonstellation dar. So erhöht sich die Chance zu erkranken bei positiver Familienanamnese um das drei bis fünffache (25). Das Risiko unter Zwillingen, dass ein Zwilling auch erkrankt, wenn der andere bereits erkrankt ist, ist ebenfalls höher, als in der Normalbevölkerung (26). Verschiedene Polymorphismen sind identifiziert worden, deren Auftreten häufiger mit der RA vergesellschaftet sind, als in der Normalbevölkerung. So konnte eine enge Assoziation zwischen dem Auftreten von verschiedenen Klasse II Human Leukocyte Antigene (HLA)-DR-Haplotypen und der rheumatoiden Arthritis beobachtet werden. Genannt seien hier beispielsweise die Allele HLA-DRB1\*01, DRB1\*04, HLA-DRB1\*13 und DRB1\*15, die für das sogenannte „shared epitope“ kodieren (27). Darunter versteht man ein Aminosäuremotiv, das aus fünf Aminosäure besteht. Deren Auftreten ist mit einer schweren Verlaufsform der RA assoziiert (28). Die physiologische Funktion der HLA-Klasse II-Moleküle besteht darin, den T-Helferzellen Antigene zu präsentieren. Die Assoziation von bestimmten HLA-Klasse II-Molekülen mit der RA lässt auf ein auslösendes Antigen schließen, auf welches das Immunsystem reagiert und so die Entstehung einer rheumatoiden Arthritis triggert (29).

Ein weiterer Risikofaktor, der in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat, stellt die Parodontitis dar. Auf der einen Seite gehört die Parodontitis zu den modifizierbaren Risikofaktoren, da sich diese Entzündung des Zahn umgebenden Gewebes durch regelmäßige und gründliche Zahnpflege beeinflussen lässt, auf der anderen Seite gibt es Patienten, die trotz regelmäßiger und gründlicher Zahnpflege eine solche Entzündung entwickeln, was ähnlich wie bei der rheumatoiden Arthritis, vermutlich genetisch bedingt ist (30–35). Große epidemiologische Studien konnten bereits auf Zusammenhänge zwischen der Parodontitis und der rheumatoiden Arthritis hinweisen (36). Diese konnten zeigen, dass Patienten, die an einer rheumatoiden Arthritis erkrankt sind, signifikant häufiger unter einer Parodontitis leiden (37).

## **2.2 PARODONTITIS**

---

Die Parodontitis (PD) ist eine opportunistische Infektionskrankheit, bedingt durch Bakterien, die primär zu einer Destruktion des Zahn umgebende Stützgewebes (Parodontium), bestehend aus Zahnfleisch, Ligamenten und Alveolarknochen führt. Diese entzündungsbedingte Zerstörung des Zahnhalteapparates führt unbehandelt zum Zahnverlust (38,39). Allgemein gilt die Parodontitis als Volkskrankheit. Alleine in Deutschland leiden schätzungsweise 70-99% der erwachsenen Bevölkerung an einer Parodontitis (40).

Obwohl eingehend studiert, gilt die Pathogenese als ungeklärt (41). Frühere Konzepte zur Pathogenese der Parodontitis gingen davon aus, dass die Anwesenheit einiger weniger pathogener Mikroorganismen Auslöser der Parodontitis seien (42–44). In der jüngsten Vergangenheit fand jedoch auch hier ein Paradigmenwechsel statt. So geht man heute davon aus, dass nicht die reine Anwesenheit von wenigen verschiedenen Mikroorganismen die Parodontitis auslösen, sondern vielmehr, dass eine komplexe Veränderung des dentalen Mikromilieus den Auslöser dieser komplexen Erkrankung darstellt (45). Diese chronische Veränderung der lokalen mikrobiellen Flora bezeichnet man als Dysbiosis (46,47). Durch komplexe, bis heute nur teilweise verstandene Mechanismen kommt es zu einer Störung der physiologischen bakteriellen Flora mit einer Verschiebung von einem Zustand polymikrobieller Synergie hin zur Dysbiosis, welche den mikroökologisch balancierten physiologischen Biofilm stört und so zu einer Veränderung der Homöostase in diesem Areal führt. (48). In der Folge kommt es zu einer Akkumulation von Plaques an der Zahn-Zahnfleischgrenze mit nachfolgender Zahnfleischentzündung, der Gingivitis. Aufgrund noch nicht vollständig verstandener Mechanismen gelingt es dem Immunsystem nicht, diese Entzündung als Reaktion auf bakterielle Pathogene vollständig zu bekämpfen, was in der Folge zur Zerstörung des Zahnhalteapparates und zum Zahnverlust führt (47,49).

Um die mutmaßlich an der Pathogenese beteiligten Bakterien zu klassifizieren, wurde im Verlauf einer Studien Analysen an Patienten durchgeführt, die an einer Parodontitis litten. Hierzu wurden Proben aus dem Parodontium genommen und verschiedenen parodontopathogenen Bakterien charakterisiert und klassifiziert. Die Klassifikation der Bakterien orientiert sich dabei an der Bedeutung im Krankheitsverlauf. Man geht davon aus, dass die Parodontitis in verschiedenen Phasen abläuft und die Bakterien gemäß ihren Zugehörigkeiten zu bestimmten Gruppen (Komplexen) in den verschiedenen Phasen der Erkrankung variieren und interagieren, ganz im Sinne einer dysbiotischen Synergie. Die Bakterien wurden dazu in Komplexe gegliedert. Die Hauptkomplexe sind der grüne, der orange und der rote Komplex (42). Bakterien des grünen Komplexes werden auch nach ihrem zeitlichen Verlauf in der vermuteten Pathogenese der PD als Frühkolonisierer (*engl.* early colonizers) bezeichnet. Ihrer Ansiedlung im Parodontium erfolgt früh im Krankheitsverlauf und ermöglicht Bakterien anderer Komplexe die weitere Ansiedlung im Parodontium. Ein Vertreter dieses grünen Komplexes ist *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). *A. actinomycetemcomitans* ist ein gramnegatives, fakultativ anaerob lebendes Bakterium und ist mit der aggressiven Form der Parodontitis assoziiert (42,50–52). Bakterien des orangen Komplexes werden auch als Brückenkeime (*engl.* bridging species) bezeichnet. Ihre Funktion besteht darin, nach Ansiedlung von Bakterien des grünen Komplexes die weitere Ansiedlung von anderen Bakterien zu ermöglichen. Sie

dienen als Bindeglied zwischen den Fröhkolonisierern des grünen Komplexes und den Spätkolonisierern des roten Komplexes. Ein Bakterium des orangen Komplexes ist *Fusobacterium nucleatum* (Fn). *F. nucleatum* ist ein gramnegatives, obligat anaerobes Bakterium des orangen Komplexes und ist von seiner Pathogenität hinsichtlich der PD als moderat aggressiv einzustufen (42,53,54). Bakterien des roten Komplexes bezeichnet man auch als Spätkolonisierer (*engl.* late colonizers), da sie sich erst nach Ansiedlung der Brückenkeime an der Parodontitis beteiligen. Bakterien des roten Komplexes zeichnen sich durch eine breite Ausstattung an proteolytischen Enzymen aus, die am Abbau des Parodontiums im Verlauf einer florierenden Parodontitis eine maßgebliche Rolle spielen. Ein Bakterium des roten Komplexes ist *Porphyromonas gingivalis* (Pg). *P. gingivalis* ist ein gramnegatives, obligat anaerobes Bakterium und gilt als der Markerkeim des roten Komplexes und Zeichen einer aggressiven Parodontitis (42,45,55,56). Aufgrund der Tatsache, dass *P. gingivalis* vergleichsweise leicht kultivierbar und genetisch modifizierbar ist, ist es eines der am besten untersuchten Parodontitis-typischen Bakterien überhaupt (45). Bei eingehender Analyse des Bakteriums stellte sich heraus, dass *P. gingivalis* als einziges Parodontitis-typisches Bakterium im Besitz einer eher untypischen enzymatischen Ausstattung ist. Das Bakterium besitzt eine Peptidylarginin Deiminase (PAD) und ist in der Lage, den Prozess der Citrullinierung zu katalysieren (57). Unter Citrullinierung versteht man die posttranslationale Modifikation von der im bestehenden Proteinkomplex terminal angesiedelten Aminosäure Arginin in die Aminosäure Citrullin, bei der die endständige Aminogruppe des Arginins abgespalten wird (58).

Als in den vergangenen Jahren die Analyse der Antikörper gegen zyklische citrullinierte Peptide (ACPA) als wichtiger Marker für die Diagnostik und Differenzialdiagnose der rheumatoide Arthritis herausstellte, rückten citrullinierten Proteine vermehrt in den Fokus der Rheumaforschung (32). Im menschlichen Körper gehören Citrullinierungsreaktionen zu physiologischen Prozessen. Im Zuge von Apoptose, Keratinisierung von Haut, generellen Mechanismen des zentralen Nervensystems und in der Regulation von Genen wird unter normalen Bedingungen Citrullinierung betrieben. Bis heute sind 5 Isotypen der Peptidylarginin Deiminase im Menschen charakterisiert worden (59). Unter Antikörpern gegen zyklische citrullinierte Peptide versteht man Autoantikörper, die sich spezifisch gegen bestimmte citrullinierte Proteine des Körpers richten. Unter anderem gehören dazu das cyclische Citrullin (CCP), mutiertes Vimentin (MCV), nicht mutiertes Vimentin (Sa) und Fibrin (60). Die ACPA gelten heute als unverzichtbarer Serummarker in der Diagnostik der rheumatoiden Arthritis. Im Vergleich zu den bis dato verwendeten Rheumafaktoren (RF) besitzen die ACPA eine höhere Spezifität bei vergleichbarer Sensitivität und sind somit in der Lage, die Diagnostik und Differentialdiagnostik deutlich zu verbessern (61).



Interessanterweise fand man heraus, dass sich bereits vor Auftreten klinischer Symptomen ACPA im Blut von Patienten nachweisen lassen (62). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Höhe der Serumtiter der ACPA mit der jeweiligen Schwere der rheumatoiden Arthritis korreliert und Individuen mit einem hohen Titer ein höheres Risiko haben, an einem schweren Verlauf der RA zu erkranken (63).

Derzeit wird folgender Zusammenhang zwischen der Parodontitis und der rheumatoiden Arthritis angenommen: *Porphyromonas gingivalis* ist durch seine besondere Ausstattung mit der bakteriellen PAD in der Lage, menschliche Proteine zu citrullinieren. Dies konnte experimentell nachgewiesen werden. Es war möglich, eine Citrullinierung von humaner  $\alpha$ -Enolase und Fibrinogen durch *P. gingivalis* zu induzieren. Diese beiden Proteine stellen in ihrer citrullinierten Form zwei Hauptautoantigene der rheumatoiden Arthritis dar (64). Es wird vermutet, dass diese posttranslationale Proteinmodifikation zu einer Generierung von Neoepitopen führt, gegen die das Immunsystem keine Immuntoleranz besitzt (38). Dabei bewirkt die Citrullinierung von endständigen Argininen eine Ladungsveränderung des anheftenden Proteinkomplexes und konsekutiv eine Konformitätsänderung des gesamten Proteins und somit eine Veränderung ihrer antigenen Eigenschaften (65). Bei empfänglichen Individuen mit entsprechender Kombination aus genetischer Prädisposition, modifizierbaren und nicht-modifizierbaren Risikofaktoren, kann diese fehlende Immuntoleranz zu einer Produktion und Formierung von Autoantikörper (ACPA) führen, die sich gegen diese Neoepitope richtet (66). Unterstützt wird diese Tatsache von einer Studie von Lundberg et. al., die zeigen konnten, dass Autoantikörper gegen citrullinierte humane  $\alpha$ -Enolase, gewonnen aus Serumproben von RA-Patienten, kreuzreagieren mit  $\alpha$ -Enolase, die durch *P.gingivalis* citrulliniert wurde (67). Aufgrund dessen wird nachfolgend vermutet, dass eine Form der molekularen Mimicry zu einer Kreuzreaktivität mit citrullinierten Gelenkproteinen führt, die wiederum den chronischen Entzündungsprozess zu einer rheumatoiden Arthritis eskaliert (32). Verschiedene tierexperimentelle Studien unterstützen die Theorie der molekularen Mimicry. So konnten Cantley et. al. zeigen, dass eine experimentell induzierte Arthritis in der Maus durch eine experimentell induzierte Parodontitis mit *P. gingivalis* den Verlauf der Arthritis signifikant beeinflusst und verschlimmert (68). Auch Maresz et. al. zeigten, dass eine experimentelle Arthritis durch eine Parodontitis durch *P. gingivalis* verschlimmert wird. Interessanterweise konnten zusätzlich gezeigt werden, dass diese Zunahme der Schwere der experimentellen Arthritis von der PAD von *P. gingivalis* abhängig ist. Mäuse, die mit einer Wildtypvariante von *P. gingivalis* behandelt wurden, zeigten erhöhte Titer von anti-Kollagen Typ II Autoantikörpern. Interessanterweise wurde bei Tieren, die mit einer Variante von *P. gingivalis* behandelt wurden, in der die PAD ausgeschaltet wurde (Gen-Knockout), dies nicht beobachtet (69).

## 2.3 ZIELSETZUNG DIESER STUDIE UND TIERMODELLE

---

Zur Erforschung komplexer Fragestellungen werden Tiermodelle genutzt. Ziel dieser Arbeit war es nun, zunächst, ein Modell für die Parodontitis in der Maus zu etablieren, in dem sich durch Gabe des Parodontitis-typischen Bakteriums *P. gingivalis* eine Parodontitis zuverlässig und reproduzierbar auslösen lässt. Hierzu sollte erst ein Vergleich von drei verschiedenen Mausstämmen (SKG, DBA/1J und F1 (DBA/1J x B10.Q)) durchgeführt werden, um den Mausstamm zu identifizieren, der am vulnerabelsten für die Induktion einer Parodontitis ist. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Induktion einer Parodontitis beschrieben. Die häufigsten verwendeten Methoden sind das Ligatur-Modell und das Modell der oralen Inokulation. Im Ligatur-Modell wird ein dünner Faden um die Backenzähne (Molaren) der Versuchstiere befestigt. Dabei wird der zu verwendende Faden vorher mit einer Lösung getränkt, die Parodontitis-typischen Bakterien enthält (70–72). Beim Modell der oralen Inokulation erfolgt die Applikation einer Lösung mit Parodontitis-typischen Bakterien mittels einer Pipette direkt an die Zähne der Tiere (73–75). In der Vorbereitung des Experiments stellte sich bei Inspektion der Mausanatomie heraus, dass es sich schwer gestalten würde, eine Ligatur an den Backenzähnen zu befestigen. Aufgrund der deutlich leichteren und schnelleren Durchführbarkeit wurde entschieden, dass die Induktion der Parodontitis in dieser Arbeit durch die orale Inokulation erfolgen sollte.

Nach erfolgreicher Etablierung eines Modells für die Parodontitis in der Maus sollte der Einfluss verschiedener mit Parodontitis assoziierter Bakterien (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), appliziert entweder alleine oder in Kombination, auf den Verlauf und die Progression der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) untersucht werden. Als Tiermodell diene der vorher identifizierte vulnerable Mausstamm. Die CIA gilt als ein etabliertes Modell in der Erforschung der rheumatoiden Arthritis (76). Ähnlich wie bei der RA, kommt es bei der CIA zu einer aufgehobenen Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen und dadurch zu einem Angriff des Immunsystems auf die Gelenk (76–78).

Hintergrund für diese Studie ist die Tatsache, dass das orale Mikrobiom sowohl von gesunden Menschen, als auch von Menschen, die an einer Parodontitis leiden, nicht nur aus einem Bakterium besteht, sondern stets eine Ansammlung vieler verschiedener Bakterienspezies und anderer Mikroorganismen darstellt. Die durch diese Diversität entstehenden Wechselwirkungen der verschiedenen Bakterien unter- und miteinander bedingt, dass Parodontitismodelle, die durch die Applikation von nur einem Bakterium diese bakteriellen Wechselwirkungen im Sinne einer Synergie nicht erfasst und somit nur sehr

entfernt der Realität entsprechen. Durch Applikation von drei verschiedenen Parodontitis-typischen Bakterien, einer aus dem grünen (*Aa*), einer aus dem orangen (*Fn*) und einer aus dem roten Komplex (*Pg*) soll versucht werden, eine vergleichsweise realitätsnahes Milieu zu erschaffen, das die realen Bedingungen einer Parodontitis widerspiegelt. Gleichzeitig sollte das mikrobiologische Setting des Experimentes hinsichtlich der applizierten Bakteriendosis und –spezies kontrollierbar sein. Zu Beginn wurden drei Hypothesen aufgestellt, die als Leitfaden dieses Experiments galten. Die erste Hypothese postuliert, dass die Induktion der Parodontitis durch orale Inokulation mit *P. gingivalis* abhängig ist von der genetischen Empfänglichkeit der verwendeten Tiere. Die zweite Hypothese nimmt an, dass die orale Inokulation von drei verschiedenen Parodontitis-typischen Bakterien in Kombination, je eines aus dem grünen, orangen und roten Komplex, eine schwerere Parodontitis hervorruft, als durch Inokulation von nur einem PD-typischen Bakteriums allein. Die dritte Hypothese dieser Arbeit vermutet, dass eine vorbestehende Parodontitis eine nachfolgend ausgelöste Kollagen-induzierte Arthritis in ihrer Manifestation verschlimmert. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dies die erste *in vivo* Studie, die den Einfluss von drei in Kombination applizierten Parodontitis-typischen Bakterien auf die Kollagen-induzierte Arthritis untersucht.

### III. MATERIAL

#### 3.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Produktbeschreibung	Hersteller	Artikelnummer
Omnifix-F Spritze 1 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 9161406V
Omnifix Luer Lock Spritze 5 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 4617053V
Bepanthen Augensalbe	Bayer AG	82290583
Micro lance 3 26G ½"	Becton, Dickinson and Company	REF 303800
M. tuberculosis des. H37 Ra 100mg	Becton, Dickinson and Company	231141
Rabbit anti-mouse IgG	Bio-Rad Laboratories, Inc.	STAR13B
Rat anti-mouse IgG1	Bio-Rad Laboratories, Inc.	MCA336P
Rat anti-mouse IgG1a	Bio-Rad Laboratories, Inc.	MCA1588P
human anti-mouse IgG2b	Bio-Rad Laboratories, Inc.	HCA038P
human anti-mouse IgG3	Bio-Rad Laboratories, Inc.	HCA039P
TMB Substrate	BioLegend	421101
Legendplex Mouse Inflammation Panel	BioLegend	740446
Multi-SafeSeal-Tubes 1,7ml	Carl Roth GmbH und Co.KG	167666071
Roti-Quant	Carl Roth GmbH und Co.KG	K015.1
Roti-Quant	Carl Roth GmbH und Co.KG	K015.1
anti-CCP ELISA strips	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG	EA 1505 G
Spritzenfilter 0,45 µm	Integra Biosciences GmbH	153015
Einbettkassette – Standard	Kabe Labortechnik GmbH	REF 053749
Cellsafe Biopsy Capsule	Leica Biosystems Nussloch GmbH	LOT 03701417
Graduated Pipette Tips 20 µl	nerbe plus GmbH	07-372-2015
Graduated Pipette Tips 200 µl	nerbe plus GmbH	07-376-2015
anti-MCV ELISA plates	Orgentec Diagnostika GmbH	ORG 548
Einmalhandschuhe Gr. L	Paul Hartmann AG	REF 942198
Deckgläser 24 x 50 mm	Roth	1871.2
Objekträger	Roth	PC68.1
Deckgläser 24 x 50 mm	Roth	PC67.1
End-to-End Kapillare 20 µl	Sarstedt AG & Co.	REF 19.447
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co.	REF 85.1638.235
Greiner Falcon Tube 16 C 15ml	Sigma-Aldrich	T1943 SIGMA
Medisorb 96-well plates	Thermo Fisher Scientific	467320
Medisorb 96-well plates	Thermo Fisher Scientific	442404

### 3.2 CHEMIKALIEN

Produktbeschreibung	Hersteller	Artikelnummer
Ethanol 70%	Apomix / PKH Halle GmbH	PZN 0005316
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG	PZN 04499344
Rompun 2 %	Bayer AG	82826107
Incomplete Freud Adjuvant 10ml	Becton, Dickinson and Company	263910
Esketamin 10 %	bela-pharm GmbH & Co. KG	9089.01.00
Formafix 4%	Grimm MED Logistik GmbH	F10010G
cOmplete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Hoffmann-La Roche	04693159001
Bovines Kollagen Typ II 10mg	MD Bioproducts	804001-Lyo
Usedecalc	MEDITE GmbH	REF 40-3310-00
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck	108418
Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH	H00208-0830
Cotrim K-Saft 240mg/5mg	Ratiopharm	PZN 3788230
EDTA-Dinatrium	SERVA Electrophoresis GmbH	11280
Sodium Carboxymethylcellulose	Sigma-Aldrich	1001570140
RNA later	Sigma-Aldrich	R0901
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A9418
BupH Carbonate-Bicarbonat Buffer Packs	Thermo Fisher Scientific	28382
BupH Modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Packs	Thermo Fisher Scientific	28374
Ethanol 96 % (v/v), mit Methylethylketon vergällt	UMR Zentralapotheke	-

### 3.3 GERÄTE

Produkt	Hersteller
FACSCalibur	Becton, Dickinson and Company
microCT SkyScan 1076	Bruker Corporation
Axioskop 40 Mikroskop	Carl Zeiss AG
AxioCam MRc 5 Kamerakopf	Carl Zeiss AG
Hyrax M 55 Mikrotom	Carl Zeiss AG
Centrifuge 5418R	Eppendorf AG
Thermomix comfort	Eppendorf AG
Eppendorf Reference 250 µl Pipette	Eppendorf AG
Sartorius handy Digitalwaage	Sartorius AG
Vortex IKA MS1 Minishaker	Sigma-Aldrich
Precellys 24 Homogenizer	Stretton Scientific Ltd

### 3.4 VERSUCHSTIERE

Mausstamm	Geschlecht	Alter zu Beginn	Anzahl (n)
SKG	weiblich	8-10 Wochen	15
DBA/1J	männlich	8-10 Wochen	13
F1 (DBA/1J x B10.Q)	männlich	8-10 Wochen	51

### 3.5 SOFTWARE

Produktbeschreibung	Hersteller	Verwendungszweck
1076 Control Version 2.6.5	Bruker Corporation	Computertomographie
NRecon Version 1.6.9.18	Bruker Corporation	3D-Rekonstruktion
DataViewer Version 1.5.1.2	Bruker Corporation	Ausrichtung, ROI definieren
CT Analyser Version 1.15.4.0	Bruker Corporation	Auswertung der ROI
AxioVision Rel Version 4.8	Carl Zeiss AG	Anfertigung der histologischen Bilder
Mendeley Version 1.17.11	Mendeley Ltd.	Zitierprogramm
Microsoft Excel Version 2011	Microsoft Corporation	Datenarchivierung
Microsoft Power Point Version 2011	Microsoft Corporation	Abbildungen
Microsoft Word Version 2011	Microsoft Corporation	Dissertationsschrift
SigmaPlot Version 13.0	Systat Software GmbH	Statist. Analyse / Abbildungen

## IV. METHODEN

---

### 4.1 VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG

---

Die ursprüngliche Beschaffung des DBA/1- und B10.Q-Mausstammes erfolgte von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) und die Tiere des SKG-Stammes stammen ursprünglich von Shimon Sakaguchi (79). Die nachfolgende Zucht aller im Experiment verwendeten Tiere erfolgte in der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock unter Specific-Pathogen-Free (SPF)-nahen Bedingungen. Mit Erreichen eines Alters von ca. 8-10 Wochen wurden die Tiere in den Infektionstierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock überführt. Ausnahme waren hierbei die Tiere der Kontrollgruppe im ersten durchgeführten Experiment (Vorexperiment), die bis zur Euthanisierung ausschließlich unter SPF-nahen Bedingungen lebten. Die Tierhaltung erfolgte in Käfigen von mindestens 2 bis maximal 5 Tieren pro Käfig, wobei jeder Käfig durch eine Lüftungsanlage separat mit gefilterter Luft belüftet wurde, um Kreuzkolonisierung mit anderen Bakterien zu vermeiden. Die Tiere wurden einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt. Die Temperatur im Infektionstierstall betrug  $25 \pm 5$  °C mit einer Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5$  %. Die Käfige wurden jede oder jede zweite Woche, je nach Verschmutzungsgrad gewechselt. Als Trinkwasser diente Leitungswasser und als Futter wurde Standardfutter verwendet. Der Zugang zu Futter und Trinkwasser erfolgte *ad libitum*. Ein Wechsel des Trinkwassers und des Futters wurde bei Bedarf oder beim regulären Käfigwechsel durchgeführt. Eine Ober- oder Untergrenze für die Nahrungsaufnahme wurde nicht festgelegt. Die durchgeführten Versuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V; ([www.lalif.de](http://www.lalif.de)) genehmigt (Aktenzeichen: 7221.3-1.1-052/14). Alle Experimente wurden gemäß den gängigen Richtlinien und Gesetzen durchgeführt.

### 4.2 BAKTERIENZUCHT UND - AUFBEREITUNG

---

Die Herstellung der verwendeten Bakterien erfolgte durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer, Frau Dr. Katja Kriebel und Frau Dr. Cathleen Hieke. Die Anzucht von *Porphyromonas gingivalis* W83 (Pg) und *Fusobacterium nucleatum* (Fn) erfolgte in Peptone Yeast Extract Glucose Broth Medium (PYG) unter Zugabe von 5 mg/ml Hemin und 1 % Vitamin K in anaerober Atmosphäre (10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 80 % N<sub>2</sub>). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) wurde in Brain Heart Infusion Medium (BHI) bei 37 °C und Raumatmosphäre unter Zusatz von 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die

Bakterien wurde über Nacht bis zur mittleren exponentiellen Phase (log) im jeweiligen Medium angezüchtet. Nachfolgend wurde die Bakterienlösung zentrifugiert, das Medium als Überstand entfernt, mit PBS gewaschen und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) resuspendiert. Aliquots in der Größe von  $2 \times 10^9$  koloniebildenden Einheiten (KBE) in 2000 µl DMEM wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C separat eingefroren.

An den jeweiligen Experimenttagen wurden die einzelnen Aliquots vor Applikation bei 37 °C und 600 rpm für ca. 3 Minuten mit dem Thermomixer aufgetaut. Anschließend wurden die Bakterien bei 4 °C und 10 000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Das Kulturmedium als Überstand wurde entfernt und die Bakterien mit 50 µl PBS unter Zusatz von 2 % Carboxymethylcellulose (CMC) resuspendiert. Das Ergebnis war eine applikationsfertige Einheit pro Aliquot. Um sicherzustellen, dass sich die Bakteriendosis während des Experimentzeitraumes nicht ändert und um bei Bedarf Änderungen vorzunehmen, erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Monitoring der eingefrorenen Bakterien. Hierzu wurde nach 4, 12, 16, 20, 24, 28 und 32 Wochen nach Herstellung der Bakterien jeweils ein Aliquot aufgetaut, die Bakterien ausplattiert und die vitalen koloniebildenden Einheiten ausgezählt.

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterien**

Bakterium	Charakteristika	Bezeichnung	Ursprüngliche Herkunft
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gramnegatives, obligat anaerob lebendes Stäbchenbakterium, Wildtyp-Stamm 83, Mitglied des roten Komplex	Bakterienbank der UMR	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, UMR
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Gramnegatives, obligat anaerob lebendes Stäbchenbakterium, Wildtyp-Stamm, Mitglied des orangen Komplexes	ATCC 25586	American Type Culture Collection
<i>Actinobacter actinomycetemcomitans</i>	Gramnegatives, fakultativ aerob lebendes Stäbchenbakterium, Wildtyp-Stamm, Mitglied des grünen Komplexes	DSMZ 11123	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

#### 4.3 ANÄSTHESIE DER VERSUCHSTIERE

Um eine möglichst präzise Applikation der Bakterien auf und an die Zähne der Tiere zu gewährleisten, mussten die Versuchstiere narkotisiert werden. Zur Narkoseeinleitung wurde den Tieren 0,75 mg Esketamin in Kombination mit 0,05 mg Xylazin pro 10 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Injektion erfolgte in den rechten Unterbauch durch vorsichtige Penetration des Fells und der Haut. Die Kombination der Arzneimittel in der gewählten Dosierung macht nicht atemdepressiv, sodass auf eine Beatmung und Überwachung der Vitalparameter verzichtet werden konnte. Da sämtliche Tiere während der Narkose nicht in der Lage waren ihre Augen zu schließen, wurden die Hornhäute der Augen mit Augen- und



Nasensalbe bedeckt und feucht gehalten. Nach der Bakterienapplikation wurden die noch narkotisierten Tiere zurück in ihren jeweiligen Käfig gelegt. Die reguläre Nahrung wurde den Tieren für eine Stunde nach Applikation der Bakterien verwehrt. Während der Narkoseausleitung wurden die Käfige vor einer Wärmelampe platziert, um einen möglichen Abfall der Körpertemperatur zu verhindern.

#### **4.4 INDUKTION DER PARODONTITIS**

---

In Vorbereitung auf die Induktion der Parodontitis wurde bei den Tieren zu Beginn des Experiments eine zehntägige Antibiotikatherapie zur Eliminierung der nativen oralen bakteriellen Flora durchgeführt. Hierzu wurde dem Trinkwasser 2 % Cotrimoxazol-Saft hinzugefügt. Die eigentlichen oralen Inokulationen mit Bakterien wurde dann wie folgt durchgeführt: Nach Aufbereitung der Bakterien und gesicherter Anästhesie der Tiere wurde die Bakteriensuspension mit Hilfe einer Pipette direkt auf Zähne des rechten Unterkiefers appliziert. Dabei wurde stets darauf geachtet, die Suspension gleichmäßig über alle drei vorhandenen Molaren des rechten Unterkiefers zu verteilen. Das Volumen belief sich hierbei auf insgesamt 50 µl pro Tier, aufgeteilt in zwei Dosen à 25 µl. Sham-inokulierte Tiere erhielten orale Inokulationen mit 50 µl PBS unter Zusatz von 2 % Carboxymethylcellulose (CMC) ohne Bakterien.

#### **4.5 INDUKTION DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS (CIA)**

---

Bei der Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) erfolgte die Durchführung nach Brand et. al. (77) durch ein zweizeitiges Vorgehen, bei dem zuerst eine Primärimmunisierung und nachfolgend eine Sekundärimmunisierung durchgeführt wurde. Die Primärimmunisierung erfolgte in dieser Arbeit im Folgeexperiment an Tag 42 und die Sekundärimmunisierung drei Wochen später an Tag 63. Zur Herstellung der Injektionslösung wurde 17,4 M Eisessig auf 0,1 M Essigsäure mit destilliertem Wasser verdünnt und durch einen Spritzenfilter gereinigt. Nachfolgend wurden 5 ml der 0,1 M Essigsäure mit 10 mg bovinen Kollagen Typ II unter ständigem Rühren über Nacht bei 4 °C vermengt. Die entstandene Lösung mit einer Konzentration von 2 µg Kollagen pro µl Suspension wurde in gemäß den Gruppengrößen entsprechende Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Herstellung des kompletten Freuds-Adjuvanz (CFA) wurden 100 mg hitzegetötetes *Mykobacterium tuberculosis* mit 25 ml inkompletten Freuds-Adjuvanz (IFA) vermischt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die definitive Herstellung der Injektionslösung durch Vermengung der Kollagensuspension mit IFA oder CFA erfolgte kurz vor Applikation an den jeweiligen Experimenttagen. Vor der eigentlichen

Injektion wurden die Aliquots mit Kollagensuspension bei Zimmertemperatur aufgetaut und das CFA aus dem Kühlschrank entnommen. Danach erfolgte die Aufnahme der gewünschten Menge CFA in eine 1 ml Spritze, sowie die Aufnahme einer äquivalenten Menge Kollagensuspension in eine separate 1 ml Spritze. Es war besonders darauf zu achten, keine Luftblasen in den Spritzen zu haben. Die Menge der hergestellten Injektionslösung pro Aliquot wurde an die jeweilige Anzahl der zu injizierenden Tiere angepasst. Schlussendlich sollte jedem Tier ca. 280 µg *M. tuberculosis* und 140 µg bovines Kollagen Typ II in einem Gesamtvolumen von 140 µl verabreicht werden. Zur Vermischung der beiden Substanzen wurden beide Spritzen auf einen Konnektor gesteckt, der beide Spritzen miteinander verbindet und der Spritzeninhalt der einen Spritze wurde durch den Konnektor in die andere Spritze überführt und *vice versa*. Dieser Vorgang wurde insgesamt 50x zügig durchgeführt, sodass sich die beiden Suspensionen gut durchgemischt haben und sich letztlich nur noch in einer Spritze befanden. Nachfolgend wurde die Entnahme der Tiere aus dem Käfig und die Fixierung mit Hilfe einer Halterung durchgeführt, bei der man freien Zugang zur Schwanzbasis des jeweiligen Tieres hatte, ohne dass sich das Tier durch ruckartige Bewegungen selbst verletzen konnte. Bei gesicherter Fixierung erfolgte die Injektion des Kollagen-CFA-Gemisches in 2 Dosen à 70 µl in die rechte und linke Seite der Schwanzbasis des Tieres direkt unter das Fell als Depot. Nach Injektion wurden die Tiere aus der Halterung genommen und zurück in den ursprünglichen Käfig gesetzt. Die Sekundärimmunisierung der kollagen-induzierten Arthritis wurde drei Wochen nach der Primärimmunisierung an Tag 63 durchgeführt. Es erfolgte die Vorbereitung der Injektionslösung analog dem Vorgehen der Primärimmunisierung, jedoch mit dem Unterschied, dass das aufgetaute Kollagen mit einer gleichen Menge inkompletten Freuds-Adjuvanz gemischt wurde. Das weitere Vorgehen, inklusive der Vermengung der beiden Substanzen, die Fixierung der Tiere und die Injektion des Substanzgemisches in die Schwanzbasis der Tiere ist dem Vorgehen der Primärimmunisierung gleich.

#### **4.6 KONTROLLE DES KÖRPERGEWICHTS**

---

Die Kontrolle des Körpergewichts der Tiere erfolgte im Hauptexperiment kontinuierlich. Während der Antibiotikatherapie und während der oralen Inokulation wurde die Kontrolle alle zwei Tage durchgeführt. Nach der letzten Inokulation erfolgte die Kontrolle alle drei Tage. Als Abbruchkriterien wurde im Vorfeld ein Gewichtsverlust von mehr als 10 % innerhalb weniger Tage definiert. Die Kontrolle erfolgte durch Wiegen der wachen Tiere mit einer herkömmlichen Digitalwaage. Die gemessenen Werte wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

#### 4.7 VERLAUFSKONTROLLE DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Um den Verlauf und die Schwere der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) zu quantifizieren, wurden die Tiere alle drei Tage nach abgeschlossener Sekundärimmunisierung untersucht. Das verwendete System zur Quantifizierung basiert auf der äußerlichen Begutachtung aller vier Pfoten pro Maus. Hierbei wurden folgende Punkte für betroffene Körperregionen vergeben:

**Tabelle 2: Scoring zur Quantifizierung der Kollagen-induzierten Arthritis**

Punktwert	Beschreibung
0	Keine Anzeichen für Entzündung
1	Rötung / Schwellung pro betroffene Phalanx
5	Rötung / Schwellung im Bereich Metacarpal- und Metatarsalknochen
5	Rötung / Schwellung für betroffene Carpalknochen und -gelenke

So ergab die komplett asymptomatische Arthritis einen minimalen Punktwert von 0 Punkten pro Tier, während eine maximal ausgeprägte Arthritis einen Punktehöchstwert von 15 Punkten pro Pfote und damit insgesamt 60 Punkten pro Tier ergibt.

#### 4.8 QUANTIFIZIERUNG DER PARODONTITIS

Nach abgeschlossenem Versuchsprotokoll erfolgte die Euthanisierung der Tiere in tiefer Narkose durch zervikale Dislokation an Tag 85. Für die Entnahme der Unterkieferknochen wurden mit Hilfe einer Knochenschere die Rami mandibulae inklusive des anhängenden Weichteilgewebes durchtrennt und der Unterkiefer von Bindegewebe grob befreit. Die Asservierung erfolgte in einem 15 ml Tube mit 10 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 7 Tage. Anschließend erfolgte eine Spülung unter fließendem Leitungswasser für 30 Minuten. Nachfolgend wurden die Unterkiefer in 0,9 % NaCl bei 4 °C gelagert. Die weitere Analyse erfolgte im micro-Computertomograph ( $\mu$ CT). Hierzu wurden die Proben aus der Kochsalzlösung genommen und in eine herkömmliche Klarsichtfolie gewickelt, wobei stets darauf zu achten war, dass die einzelnen Unterkiefer immer mit ausreichend 0,9 % NaCl benetzt waren, um ein Austrocknen zu verhindern. Insgesamt wurden pro Durchlauf des  $\mu$ CT 7 bis maximal 8 Unterkiefer gescannt. Die Zeit pro Scan und Unterkiefer betrug ca. 45 Minuten.

**Tabelle 3: Übersicht über die gewählten Einstellungen der Scan-Software 1076 Control**

Parameter	Einstellung
Voxelgröße	9 $\mu\text{m}$
Filter	Aluminium 0,5 mm
Rotationsschritt der Röntgenquelle	0,5 °
Mittlere Bildfeldberechnung	3
Spannung der Röntgenquelle	48 kV
Stromstärke der Röntgenquelle	200 $\mu\text{A}$

Nach der Gewinnung der Rohdaten mussten die einzelnen zweidimensionalen Bildersätze mit Hilfe der Software NRecon zu einem dreidimensionalen Bildsatz rekonstruiert werden. Folgende Einstellungen wurden in der Software vorgenommen:

**Tabelle 4: Übersicht über die gewählten Einstellungen der Scan-Software NRecon**

Parameter	Einstellung	Funktion
defect pixel masking	20%	Ausgleich von Pixelartefakte
smoothing	2	Glättung, verringert Bildrauschen
beam hardening correction	30%	Korrektion niedrig energetischer Strahlung
Ring artefact reduction	6	Ausgleich von Artefakte

Als nächstes wurde mit dem Programm CTAnalyser die Region Of Interest (ROI) festgelegt. Die ROI beschreibt das Areal, dass schlussendlich untersucht werden soll. Hierzu muss das zusammengesetzte dreidimensionale Bild des Unterkiefers in allen drei Ebenen des dreidimensionalen Raums ausgerichtet werden. Da die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Ausrichtung und Auswertung von Unterkiefern im  $\mu\text{CT}$  sich nicht als ausreichend detailliert erwiesen, wurde ein eigenes Verfahren zur Ausrichtung und Auswertung von Unterkiefer entwickelt, um eine vergleichbare und reproduzierbare Analyse zu gewährleisten (s. Ergebnisse).

## 4.9 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG

Die histologische Aufarbeitung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Marlies Dettmer. Zur Validierung einer Entzündungsreaktion in den Extremitäten erfolgte die histologische Aufarbeitung des rechten Hinterlaufs. Nach zervikaler Dislokation erfolgte die Durchtrennung der Wirbelsäulen knapp oberhalb der Darmbeinschaufeln. Anschließend wurde das Becken in der Sagittalebene entlang der Wirbelsäule durchtrennt. Das noch anhaftende Weichgewebe wurde entfernt. Die jeweiligen Hinterläufe mit anhaftendem Hemipelvis wurden getrennt in Histokassetten in 4 % PFA fixiert. Nach 2 Wochen erfolgte die Spülung unter Leitungswasser mit anschließender Überführung in 70 % Ethanol zur weiteren Lagerung. Die Histokassetten wurden dann bei Bedarf erneut mit Leitungswasser für 30 Minuten gespült und zur Entkalkung in Usedecalc® überführt.

**Tabelle 5: Protokoll zur Knochenentkalkung**

Arbeitsschritt	Prozedur
1.	Knochen aus PFA 4% entnehmen
2.	Spülung unter Leitungswasser für 30 Minuten
3.	Knochen in UseDecalc® einlegen, gelegentlich schütteln
4.	Stich-Kontrolle mit Hilfe einer Safety-Multifly®-Kanüle
5.	Knochen zurechtschneiden auf gewünscht Größe
6.	Spülung unter Leitungswasser für 30 Minuten
7.	Überführung der Knochen in Histokassetten in Ethanol 70%
8.	Überführen in Parafrinblock

Nach 6 Tagen erfolgte die Kontrolle des Dekalzifizierungsprozesses. Hierzu wurde eine Punktion der Femora mit Hilfe einer Butterfly-Kanüle durchgeführt. Je nach Konsistenz der Femora wurden diese entweder erneut in 70 % Ethanol nach nochmaligem Spülen mit Leitungswasser überführt oder es wurde die Freipräparation der Gelenke durchgeführt. Ziel der gründlicheren Präparation war dabei eine bessere Penetration der Dekalzifizierungslösung bei einem weiteren Zyklus mit Usedecalc®. Hierzu wurde die Pfoten knapp oberhalb des oberen Sprunggelenkes entfernt, sowie die Tibiae, Fibulae und Femora kniegelenksnah durchtrennt. Muskeln, sowie Fett wurden gelenkschonend entfernt. Um eine mögliche Artefaktbildung durch Bewegung bei Präparation zu verhindern, wurde ein dünner Rest Weichgebe an den Gelenken belassen. Die Pfoten wurden nachfolgenden getrennt erneut in Histokassetten und frischem Usedecalc® eingelegt. Nach weiteren vier Tagen der

Dekalzifizierung erfolgte die Spülung der Histokassetten mit fließendem Leitungswasser, sowie die sich anschließende Überführung in 70 % Ethanol. Anschließend wurde die Einbettung in Paraffin durchgeführt. Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit Hilfe eines Microtoms. Die Schnittdicke betrug 5 µm. Die angefertigten Schnitte wurden auf einem Objektträger fixiert und eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt.

Tabelle 6: Protokoll der HE-Färbung

Arbeitsschritt	Färbung	Dauer
1.	Roti-Histol	10 Min.
2.	Roti-Histol	10 Min.
3.	Propanol	5 Min.
4.	Propanol	5 Min.
5.	Ethanol 96%	5 Min.
6.	Ethanol 80%	5 Min.
7.	Ethanol 70%	5 Min.
8.	Aquadest	5 Min.
9.	Aquadest	5 Min.
10.	Hämalaun	25 Sekunden
11.	Spülung fließendes Leitungswasser	30 Min.
12.	Aquadest	5 Min.
13.	Eosin	2 Min.
14.	Aquadest	3x eintauchen
15.	Ethanol 70% + 1 Tropfen NH <sub>3</sub>	3x eintauchen
16.	Ethanol 80%	5 Min.
17.	Ethanol 96%	5 Min.
18.	Propanol	5 Min.
19.	Propanol	5 Min.
20.	Roti-Histol	5 Min.
21.	Roti-Histol	über Nacht
22.	Eindecken mit Kanadabalsam verdünnt mit Xylol	über Nacht

#### 4.10 BLUTANALYSE

Die Analyse der Mausseren erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Herrn Johann Volzke. Die semiquantitative Bestimmung der murinen IgG Antikörper gegen *P. gingivalis*, *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* erfolgte für jedes Tier zum Ende des Beobachtungszeitraums. Zusätzlich erfolgte eine Analyse von Antikörpern gegen bovines und murines Kollagen Typ II, sowie die Bestimmung der Antikörper gegen citrullinierte

Proteine (ACPA). Die Messung der Antikörper wurden mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung von inflammatorischen Zytokinen mittels Durchflusszytometer.

Die Blutentnahme wurde einmalig in tiefer Narkose kurz vor der zervikalen Dislokation durchgeführt. Es erfolgte die Punktion des retrobulbären venösen Plexus mit Hilfe einer Glaskapillare entlang der medialen Lidspalte. Das gewonnene Blut wurde nach abgeschlossener Punktion bei 10 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Serum als obere Phase wurde abgetragen und bis zur weiteren Analyse bei - 20 °C eingefroren.

Die Analyse der Antikörpertiter gegen *P. gingivalis*, *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* erfolgte wie bereits beschrieben (80) mit einigen Modifikationen. Es wurden  $2 \times 10^9$  KBE des jeweiligen Bakteriums in 600 µl Karbonat-Bikarbonatpuffer (pH 9,4) unter Zusatz von 1 mM EDTA und einem Proteaseinhibitorcocktail resuspendiert. Die mechanische Homogenisierung erfolgte insgesamt dreimal bei jeweils 6000 rpm für 30 s. Zwischen den Intervallen wurden die Proben auf Eis gekühlt. Für die Antikörperbestimmung wurden dann 100 µl des hergestellten Bakterienlysates in einer Proteinkonzentration von 1 µg/ml Karbonat-Bikarbonatpuffer auf 96-Well Platten aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Beschichtung erfolgte am darauffolgenden Tag das dreimalige Waschen mit 0,05 % Tris gepufferter Salzlösung / Tween-20 (TBS/T) Puffer. Zur Blockierung der verbleibenden Proteinbindungsstellen am Plastik erfolgte die Gabe von 2 % PBS gepuffertem bovinem Serumalbumin (BSA). Nach nochmaligem Waschen wurden die Seren der Versuchstiere in einer Verdünnung von 1 : 200 mit 1 % BSA in PBS auf die Platten aufgetragen und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschung wurden die Platten mit dem Peroxidase-gekoppelten Detektionsantikörper (anti-Maus IgG, 1:2000) versetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur erneut inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde durch Zugabe von Substrat (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) die Farbreaktion gestartet, welche nach 15 min durch Zugabe von 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt wurde. Anschließend wurde die Extinktion bei 450 nm mit einem ELISA-Reader Millenia Kinetic Analysers ermittelt. Die Analyse der antibakteriellen Antikörper erfolgte für jede Maus in Dreifachbestimmung.

Die Bestimmung der Antikörpern gegen bovines und murines Kollagen Typ II wurde wie bereits beschrieben (81) durchgeführt. Hierzu wurde bovines und murines Kollagen Typ II in einer Konzentration von 20 µg/ml in Karbonat-Bikarbonatpuffer Puffer auf ELISA-Platten gebunden. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C erfolgte die Blockierung und Waschung der ELISA-Platten. Anschließend wurden die Sera der Versuchstiere in einer Verdünnung von 1 : 6000 hinzugefügt und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Waschung wurde der Peroxidase-gekoppelte Detektionsantikörper (anti-Maus IgG) hinzugegeben. Nach Stoppen der Farbreaktion durch Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> erfolgte die

Messung der Extinktion bei 450 nm. Die Analyse erfolgte für jedes Tier in Zweifachbestimmung.

Die Bestimmung der Antikörper gegen zyklische citrullinierte Proteine erfolgte wie bereits beschrieben (81). Die Seren der Versuchstiere wurden in einer Verdünnung von 1 : 50 (CCP2) und 1 : 200 (MCV) auf ELISA-Platten aufgebracht, auf denen bereits die cyclische citrullinierte Peptiden 2 (CCP2) und das mutiertes citrulliniertes Vimentin (MCV) als Antigen gebunden waren. Anschließend erfolgte die Inkubation für insgesamt 1,5 Stunden bei Raumtemperatur, sowie nachfolgend die Inkubation des Peroxidase-gekoppelten Detektionsantikörper in einer Verdünnung von 1 : 1000 für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach Stoppen der Farbreaktion mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  erfolgte die Messung der Extinktion bei 450 nm. Die Analyse der ACPA wurde für jede Maus in Zweifachbestimmung durchgeführt.

Die inflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, GM-CSF, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , MCP-1 und TNF $\alpha$  wurde mit Hilfe eines Multiplex Kits (LEGENDplex, BioLegend) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Messung wurde mit einem FACSVerse durchgeführt. Als Hintergrund für die Analysen dienten Seren der gänzlich unbehandelten Kontrolltiere aus dem Vorexperiment.

#### **4.11 STATISTISCHE ANALYSE**

---

Die Datensätze wurden gruppenweise gesammelt und wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung untersucht, sowie das arithmetische Mittel (fortan als „Mittelwert“ bezeichnet) berechnet. Die Darstellung der Daten erfolgte entweder als Mittelwert oder als Dotplot der Einzelwerte.

Der Vergleich der Versuchsgruppen wurde mit Hilfe des zweiseitigen T-Tests oder dem One-way ANOVA-Test durchgeführt. Der Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen inflammatorischen Zytokine erfolgte mittels hierarchischem Clustering. Die Darstellung der Inzidenz der Kollagen-induzierten Arthritis erfolgte durch eine Kaplan-Meier-Kurve. Die Berechnungen hierzu erfolgte mit Hilfe des Log-Rank- (Mantel-Cox), Breslow- (generalisierter Wilcoxon) und Tarone-Ware-Test. Die durchgeführten statistischen Tests erfolgte mit Sigma Plot® (Version 13.0) oder SPSS® (Version 22). P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert. Die dazugehörige Darstellung geschah folgendermaßen:

\* p = 0,01 – 0,05

\*\* p = 0,001 – 0,01

\*\*\* p = 0,0001 – 0,001



## V. ERGEBNISSE

### 5.1 STUDIENDESIGN

Ziel dieser Studie war es auf der einen Seite, ein Tiermodell zu etablieren, in dem eine Induktion der Parodontitis (PD) durch orale Applikation von Parodontitis-typischen Bakterien zuverlässig und reproduzierbar möglich war. Auf der anderen Seite sollte der Einfluss verschiedener oraler Pathogene auf die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) im Mausmodell untersucht werden. Hierzu bestand der Aufbau des Experiments aus zwei Elementen. Der genaue zeitliche Ablauf beider Versuchsreihen ist in Abbildung 1 dargestellt. Zu Beginn erfolgte ein Vorexperiment, das dazu diente, einen Mausstamm zu identifizieren, bei dem sich durch orale Inokulation mit *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) eine Parodontitis zuverlässig und reproduzierbar auslösen lässt. Die Versuchstiere wurden dazu wie folgt aufgeteilt:

**Tabelle 7: Übersicht über die Versuchsgruppen im Vorexperiment**

Gruppe	1	2	3	4	5	6
Modus	Intervention	Kontrolle	Intervention	Kontrolle	Intervention	Kontrolle
Stamm	SKG	SKG	DBA/1J	DBA/1J	F1 (DBA/1J x B10.Q)	F1 (DBA/1J x B10.Q)
Gruppengröße	n=10	n=5	n=8	n=5	n=7	n=5
Antibiotika	+	-	+	-	+	-
Inokulation mit <i>P. gingivalis</i>	+	-	+	-	+	-

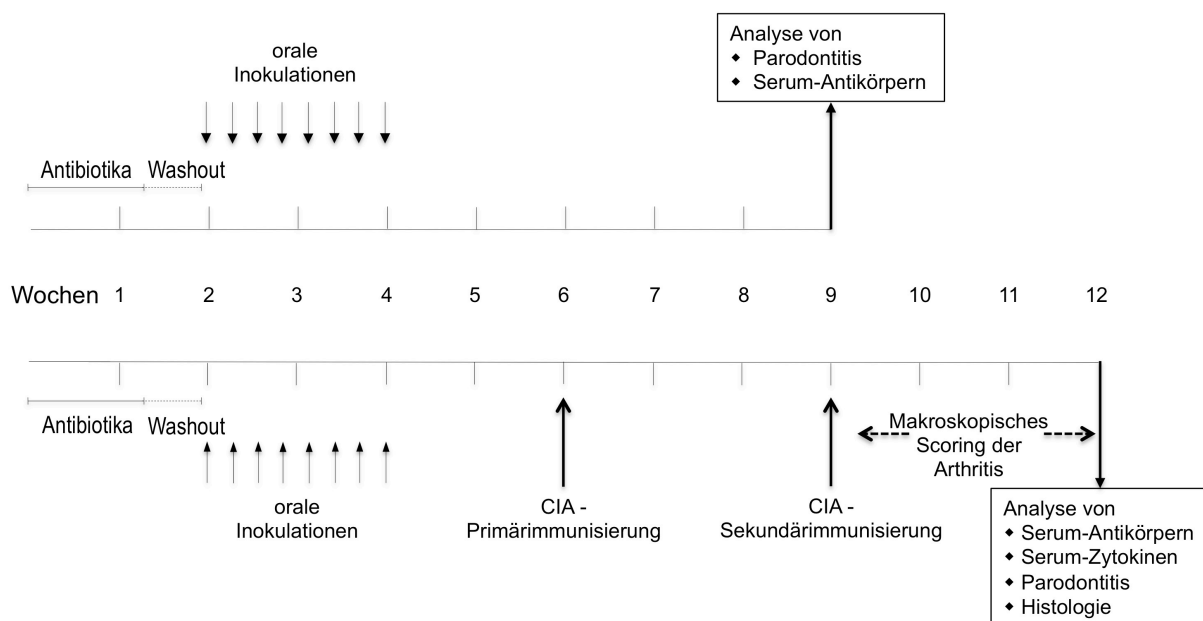
Die Experimentphase des Vorexperiments pro Tier dauerte insgesamt 9 Wochen. In dieser Phase erfolgten unterschiedliche Interventionen zu verschiedenen Zeitpunkten, die jedoch bei jedem Tier immer gleich angeordnet waren. In den ersten 10 Tagen des Experiments erfolgte eine antibiotische Behandlung durch Zusatz von Cotrimoxazol in das Trinkwasser. Anschließend schloss sich eine dreitägige Washout-Phase an, in der reines Trinkwasser gereicht wurde. Ab Experimenttag 14 wurde bei jedem Versuchstier an jedem zweiten Tag eine orale Inokulation mit *P. gingivalis* in Narkose für insgesamt 8 Inokulationen pro Tier durchgeführt. Nach Ablauf der 8 Inokulationen pro Tier schloss sich eine Beobachtungsphase von 5 Wochen an, in der keine Intervention durchgeführt wurde. Während dieser Zeit hatten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Nach Durchführung des Experiments erfolgte die Euthanisierung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation in tiefer Narkose mit nachfolgender Auswertung des Experiments.

Tabelle 8: Einteilung der Gruppen im Hauptexperiment

Gruppe	1	2	3	4	5
Inokulation	<i>P. gingivalis</i> (Pg)	<i>F. nucleatum</i> (Fn)	<i>A. actinomycetemcomitans</i> (Aa)	Pg + Fn + Aa	sham
Stamm	F1 (DBA/1J x B10.Q)	F1 (DBA/1J x B10.Q)	F1 (DBA/1J x B10.Q)	F1 (DBA/1J x B10.Q)	F1 (DBA/1J x B10.Q)
Gruppengröße	n=8	n=8	n=7	n=7	n=9

Nach Auswertung und Identifizierung eines vulnerablen Mausstammes erfolgte das sich anschließende Hauptexperiment nur diesem einen vulnerablen Stamm. Im Anschluss an das Vorexperiment wurde ein Hauptexperiment durchgeführt, in dem der Einfluss einer Parodontitis, ausgelöst durch drei verschiedene aber zusammen applizierte Bakterien (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), auf die Kollagen-induzierte Arthritis untersucht wurde. Die simultane Applikation der drei genannten Bakterien wird fortan weiter als „Bakterienmix“ bezeichnet. Die Experimentdauer des Hauptexperiments betrug insgesamt 84 Tage (12 Wochen) pro Tier. Analog zum Vorexperiment wurde in den ersten 10 Tagen dem Trinkwasser der Tiere das Antibiotikum Cotrimoxazol zugefügt. Es schloss sich eine dreitägige Washout-Phase an, in der reines Trinkwasser gereicht wurde. Die oralen Inokulationen mit den Bakterien erfolgten ab Experimenttag 14 an jeden zweiten Tag. Insgesamt wurden 8 orale Inokulationen pro Tier durchgeführt. Sham-inokulierte Tiere erhielten orale Inokulationen PBS unter Zusatz von Carboxymethylcellulose ohne Bakterien und dienten als Kontrolle. Zur Differenzierung der Effekte des Bakterienmixes auf die Versuchstiere, bestehend aus allen drei Bakterien in Kombination, wurden zusätzlich drei weitere Versuchsgruppen etabliert. Jeweils eine Gruppe erhielt orale Inokulationen mit entweder *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* oder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Die exakte Aufteilung der Versuchstiergruppen ist in Tabelle 8 dargestellt. Im Anschluss an die oralen Inokulationen erfolgte eine Beobachtungsphase bis Experimenttag 42. In dieser Beobachtungsphase fanden keine Interventionen statt. An Experimenttag 42 erfolgte die Primärimmunisierung der kollagen-induzierten Arthritis mittels gelöstem bovines Kollagen Typ II in komplettem Freuds-Adjuvanz (CFA). Der Primärimmunisierung schloss sich erneut eine Beobachtungsphase an, in der keine Interventionen durchgeführt wurden. An Experimenttag 63 erfolgte die Sekundärimmunisierung der CIA mittels Injektion von bovines Kollagen Typ II in inkomplettem Freuds-Adjuvanz (IFA). Nach weiteren 3 Wochen unter Beobachtung endete die Experimentphase des jeweiligen Versuchstieres an Experimenttag 85. Die Euthanisierung erfolgte durch zervikale Dislokation in tiefer Narkose mit Asservierung der

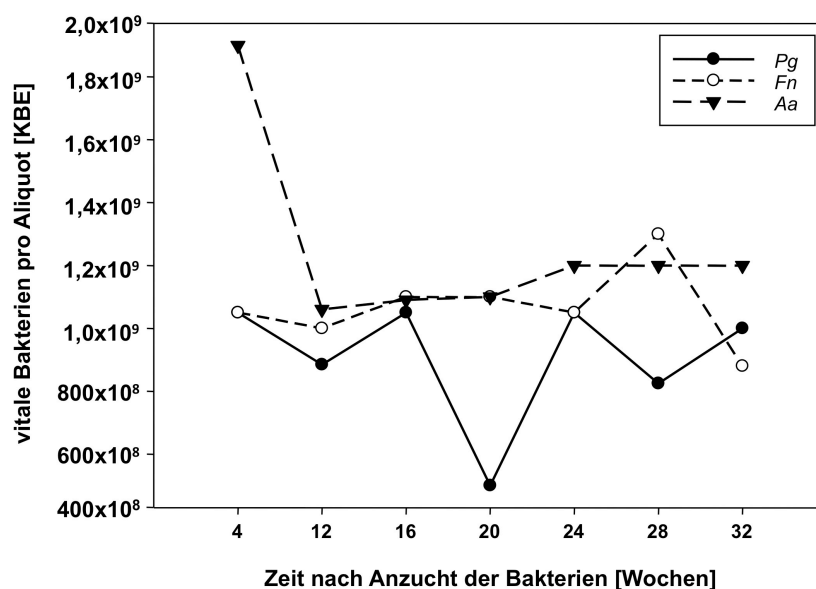
Gewebeproben und des Blutes mit anschließender Auswertung. Während des gesamten Experimentzeitraumes, sowohl im Vor- als auch im Hauptexperiment, wurde den Tieren freier Zugang zu Futter und Trinkwasser gewährt, mit Ausnahme der ersten Stunde nach oraler Inokulation. Eine Kontrolle des Körpergewichts erfolgte in der Antibiotikaphase an jedem zweiten Tag, parallel zum Wechsel der Trinkflasche. Im Hauptexperiment erfolgte die Kontrolle des Körpergewichts der Versuchstiere während der oralen Inokulationen alle zwei Tage parallel zu den Inokulationen. Nach der Phase der oralen Inokulationen erfolgte die Kontrolle des Körpergewichts alle 3 Tage. Durch die Züchtung der Versuchstiere bedingt, konnte das Experiment nicht mit allen Versuchstieren gleichzeitig begonnen werden. Die einzelnen Versuchstiere wurden in das Experiment eingeschlossen, sobald sie das vorgegebene Alter von 8 – 10 Wochen erreicht hatten. Dadurch kam es zu zeitversetzt behandelten Versuchstiergruppen. Während dieser Zeit wurden die Tiere jedoch per Zufall auf die verschiedenen Interventionsgruppen verteilt, um eine möglichst homogene Verteilung der Tiere zu gewährleisten.



**Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Experimente.** Diese Arbeit beinhaltet zwei Experimenten, ein Vor- und ein Hauptexperiment. Zunächst erfolgte bei beiden Experimententeilen eine zehntägige antibiotische Therapie der Versuchstiere mit Cotrimoxazol über das Trinkwasser. Nachfolgend schloss sich eine dreitägige Washout-Phase an, in der kein Antibiotikum gegeben wurde. Danach wurden bei jedem Tier 8 orale Inokulationen mit Bakterien (dünne Pfeile) vorgenommen. Im Vorexperiment (**oben**) schloss sich eine Beobachtungsphase bis Woche 9 an, in der keine Intervention durchgeführt wurde. Abschließend wurden die Tiere euthanisiert und die Auswertung vorgenommen. Auf die oralen Inokulationen im Hauptexperiment (**unten**) folgte eine Beobachtungsphase, in der keine Interventionen durchgeführt wurden. Nachfolgend wurde die Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) mittels Primärimmunisierung an Tag 42 (erster dicker Pfeil) und Sekundärimmunisierung an Tag 63 (zweiter dicker Pfeil) durchgeführt. Die letzte Beobachtungsphase dauert bis Experimenttag 85 (Woche 12). Es schloss sich die Euthanasierung und nachfolgend die Auswertung des Experimentes an.

## 5.2 MONITORING DER EINGEFRORENEN BAKTERIEN

Nach Anzucht der Bakterien erfolgte die Lagerung in Aliquots mit einer enthaltenden Bakteriendosis von  $2 \times 10^9$  koloniebildenden Einheiten (KBE) in 2000  $\mu$ l DMEM bei  $-80^\circ\text{C}$ . Um sicherzustellen, dass sich die Bakteriendosis im Verlauf des Experiments nicht änderte und um bei Bedarf Änderungen vorzunehmen, um die erforderliche Bakteriendosis von  $2 \times 10^9$  KBE konstant zu halten, erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Monitoring der Vitalität der eingefrorenen Bakterien. Hierzu wurde nach 4, 12, 16, 20, 24, 28 und 32 Wochen nach Herstellung der Bakterien jeweils ein Aliquot pro Bakterium aufgetaut, die Bakterien ausplattiert und die Anzahl der vitalen koloniebildenden Einheiten ausgezählt. Eine Dosisanpassung wurde durchgeführt, sobald die Auszählung eine deutlich geringer Anzahl an vitalen KBE pro Aliquot zeigte. Hierzu wurden direkt vor der eigentlichen oralen Inokulation mehrere Aliquots für eine Inokulation verwendet. Bei der ersten Auszählung vier Wochen nach Anzucht der Bakterien konnten bereits nur  $1 \times 10^9$  koloniebildenden Einheiten vitale *Fusobacterium nucleatum* (Fn) und *Porphyromonas gingivalis* (Pg) pro Aliquot aufgetaut und ausgezählt werden.

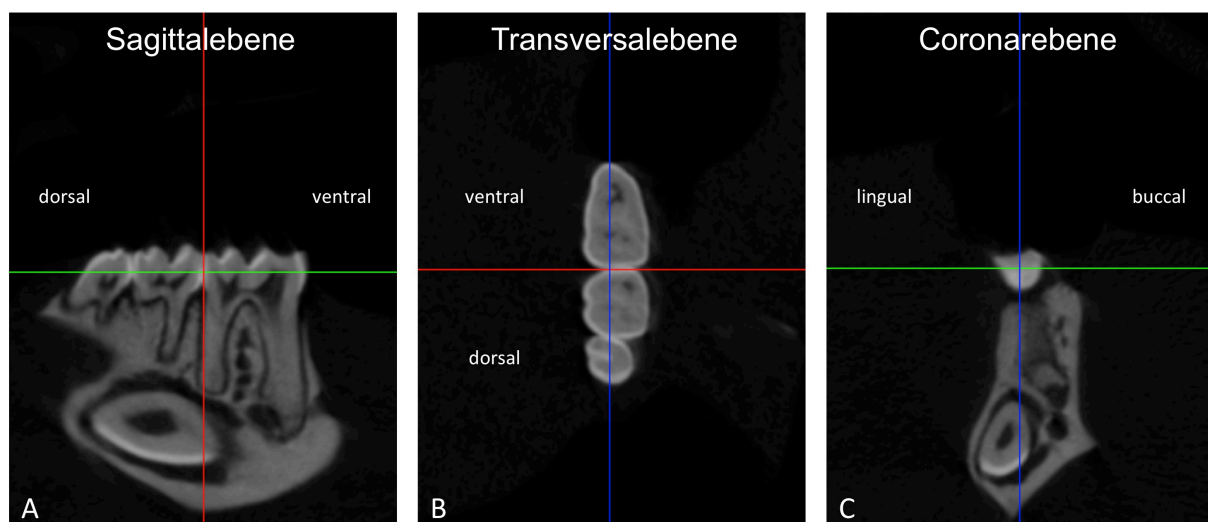


**Abbildung 2: Es mussten Dosisanpassungen vorgenommen werden.** Gemessen wurde die Anzahl der vitalen Bakterien pro Aliquot nach Anzucht. Für Pg und Fn mussten bereits vier Wochen nach Anzucht Dosisanpassungen vorgenommen werden, um die vorher definierte Bakteriendosis von  $2 \times 10^9$  KBE des jeweiligen Bakteriums pro oraler Inokulation pro Tier zu gewährleisten. Für Aa erfolgte die erste Dosisanpassung insgesamt 12 Wochen nach Anzucht. Ein Dosisabfall von *P. gingivalis* 20 Wochen nach Anzucht stellte sich als Messfehler heraus, da sich der initiale Abfall in Woche 24 als nicht mehr existent zeigte. Jedes Symbol entspricht einer Messung eines aufgetauten Aliquots und spiegelt die Anzahl der noch vitalen Bakterien wider. Abkürzungen: KBE koloniebildende Einheit. W Wochen. Pg *Porphyromonas gingivalis*. Fn *Fusobacterium nucleatum*. Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Ab diesem Zeitpunkt erfolgte für *Fn* und *Pg* eine Dosisanpassung, sodass den Tieren wieder eine Dosis von  $2 \times 10^9$  KBE, entsprechend 2 Aliquots pro Tier, appliziert wurden. Bei *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) musste erst bei der zweiten Auszählung nach 12 Wochen eine Dosisanpassung durchgeführt werden. Nach 20 Wochen zeigte sich bei *Pg* ein kurzer Abfall der Bakteriendosis pro Aliquot auf  $5 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten. Auch hier wurde nachfolgend eine Dosisanpassung durchgeführt. Bei nochmaliger Auszählung 4 Wochen später (insgesamt 24 Wochen nach Bakterienanzucht) zeigte sich der Abfall der Bakteriendosis als nicht mehr vorhanden. Diese Schwankung wurde als Messungenauigkeit bei der Auszählung der Bakterien interpretiert. Es erfolgte eine erneute Dosisanpassung, sodass den Tieren fortan wieder die ursprüngliche Bakteriendosis von zwei Aliquots pro Tier (entspricht  $2 \times 10^9$  KBE) appliziert wurden.

### 5.3 PROTOKOLL ZUR MIKROCOMPUTERTOMOGRAPHISCHEN QUANTIFIZIERUNG EINER PD

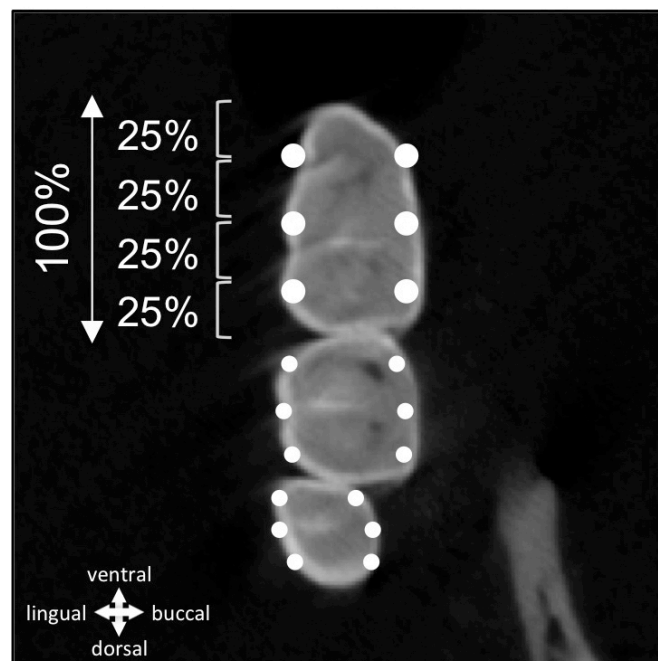
Da die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Ausrichtung und Auswertung von Unterkiefern zur Quantifizierung einer Parodontitis (PD) im mikro-Computertomographen ( $\mu$ CT) sich nicht als ausreichend detailliert beschrieben erwiesen, wurde ein eigenes Verfahren zur Ausrichtung und Auswertung von Unterkiefer entwickelt, um eine vergleichbare und reproduzierbare Analyse zu gewährleisten. Die Durchführung erfolgte streng nach Protokoll und stets gleich. Abbildung 3 beschreibt das Vorgehen zur digitalen Ausrichtung der einzelnen Ebenen im dreidimensionalen Raum mit Hilfe der Software CTAnalyzer. Zunächst wurde der Unterkiefer digital in der Sagittalebene korrekt positioniert. Hierzu wurde der Unterkiefer so ausgerichtet, dass die Transversalebene, dargestellt als grüne Linie (Abb. 3, A) knapp unterhalb der oberen Begrenzung der Pulpahöhle verlief. Danach erfolgte die Ausrichtung in der Transversalebene, sodass die Sagittalebene, dargestellt als blaue Linie (Abb. 3, B) direkt durch den Punkt, der am weitesten ventral und durch den am weitesten dorsal gelegene Punkt der Zahnreihe verläuft. Als letztes wurde der Unterkiefer in der Coronarebene ausgerichtet. Die Sagittalebene, dargestellt als blaue Linie (Abb. 3, C), verläuft hierzu direkt durch die Zahnkrone und parallel zum Wurzelkanal. Die Transversalebene schneidet dabei die Sagittalebene inmitten der Zahnkrone.



**Abbildung 3: Digitale Ausrichtung der  $\mu$ CT-Bilder der rechten Hemimandibula im dreidimensionalen Raum im CTAnalyzer.** rote Linie: Coronarebene, grüne Linie: Transversalebene, blaue Linie: Sagittalebene. **A** Ausrichtung des Unterkiefers in der Sagittalebene entlang der Transversalebene. Die Transversalebene schneidet die Zahnreihe knapp unterhalb der oberen Begrenzung der Pulpahöhlen **B** Ausrichtung des Unterkiefers in der Transversalebene entlang der Sagittalebene. Die Sagittalebene verläuft durch den Punkt, der am weitesten ventral liegt und durch den am weitesten dorsal gelegene Punkt der Zahnreihe. **C** Ausrichtung des Unterkiefers in der Coronarebene entlang der Sagittalebene. Die Sagittalebene verläuft direkt durch die Zahnkrone und parallel zum Wurzelkanal. Die Transversalebene schneidet die Sagittalebene inmitten der Zahnkrone.

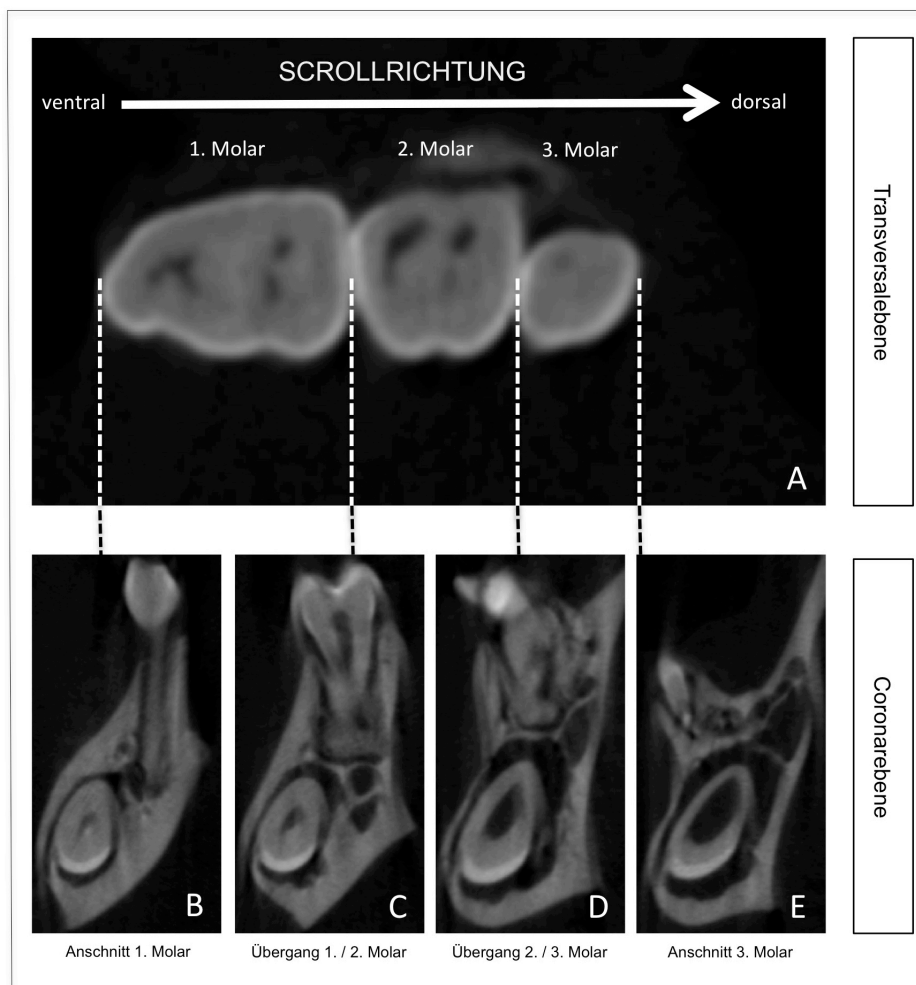
Nach erfolgter Ausrichtung der Achsen und Ebenen erfolgte die definitive Analyse der Bildsätze in ventro-dorsaler Richtung in der Coronarebene, welche der Scrollrichtung bei der Durchsicht der Bilder entspricht. Es wurde eine Messmethode entwickelt, bei der sich die Messpunkte nicht an anatomischen Strukturen orientieren, die aufgrund des physiologisch interindividuellen Wachstums unterschiedlich sein können. Stattdessen wurde jeder Zahn individuell vermessen und die Messpunkte im Verhältnis zur jeweilige Größe des Zahns gesetzt. Analog zur Inokulation der Bakterien wurde nur die rechte Hemimandibula pro Tier untersucht. Im Gebiss der Maus befinden sich pro Hemimandibula ein Schneidezahn und 3 Molaren. Es wurden nur die 3 Molaren des rechten Unterkiefers analysiert. Insgesamt wurden so für jedes Tier 18 Messpunkte definiert. Die Aufteilung der Messpunkte wurde wie folgt durchgeführt: 6 Messpunkte pro Zahn, pro Zahn jeweils 3 Messpunkte an der lingualen Zahnseite und 3 Messpunkte an der buccalen Zahnseite (Abbildung 2).

Hierzu wurde jeder Zahn des rechten Unterkiefers einzeln vermessen und die Länge des Zahnes in vier gleichlange Bereiche zu jeweils 25 % der gesamten Länge des zu untersuchenden Zahns eingeteilt. Die Messpunkte pro Zahn wurden dann individuell an den Übergängen der Teilstrecken gesetzt und ausgewertet. Hierzu wurden die Bildsätze pro Tier in ventro-dorsaler Scrollrichtung durchgearbeitet.



**Abbildung 4: Übersicht von oben auf die 18 Messpunkte entlang der drei Molaren des rechten Unterkiefers.** Der Pfeil entspricht der Gesamtlänge des 1. Molars. Die eckigen Klammern markieren jeweils 25% der Länge des Zahns in ventro-dorsaler Ausrichtung. Jeder weiße Punkt entspricht einem Messpunkt. Der Stern markiert die anatomischen Seitenverhältnisse.

Die Vermessung der einzelnen Zähne erfolgte anhand der Anzahl der Schnittbilder, die vorher als Region Of Interest (ROI) in der Coronarebene isoliert wurden. Dabei wurde das am weitesten ventral gelegene Schnittbild identifiziert in dem der Zahn mit Zahnschmelz und Zahnwurzel als solche zu erkennen war (Abb. 3, B). Nachfolgend wurde der Bildsatz weiter in ventro-dorsaler Ausrichtung durchgearbeitet, bis schlussendlich der Übergang vom ersten zum zweiten Molar erkennbar war. Dieses Bild ist gekennzeichnet durch eine überlagerte Darstellung des ersten zum zweiten Molar (Abb. 3, C). Die Anzahl der Bilder zwischen diesen vorher identifizierten Indikatorbildern wurde nun durch vier geteilt. Bei etwaigen Nachkommastellen, erfolgte ein Auf- oder Abrunden.



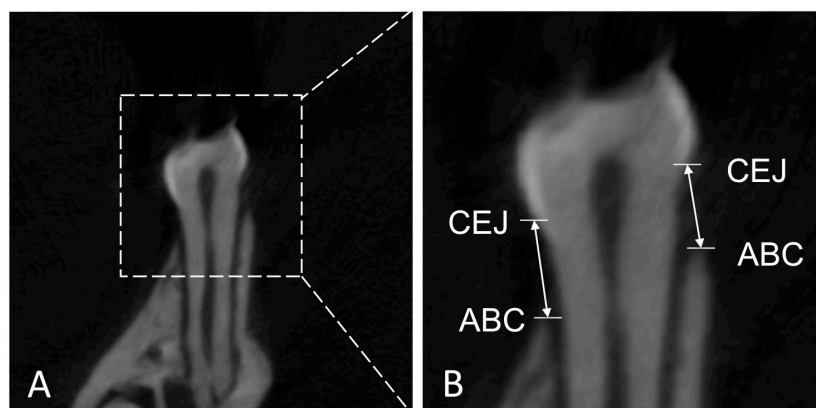
**Abbildung 5: Ablauf und Vermessung der Zahnlänge und Einteilung der Strecken zur Positionierung der Messpunkte.**  
**A** Übersicht der untersuchten Zähne des rechten Unterkiefers **B** ventral gelegenes Bild des Bildsatzes des ersten Molar markiert den Beginn der auszählende Strecke. **C** Übergang vom ersten zum zweiten Molar markiert das Ende des ersten Molar und den Beginn des zweiten Molar. **D** Übergang vom zweiten zum dritten Molar markiert das Ende des zweiten und Beginn des dritten Molar **E** dorsal gelegenes Bild des dritten Molars markiert das Ende des Bildsatzes. A Darstellung in der Transversalebene B,C,D,E Darstellung in der Coronarebene



Da die Schnittbilder im Bildsatz in ventro-dorsaler Ausrichtung automatisch beim Scanvorgang durch die Software durchnummeriert worden sind, konnten so die Bilder an den jeweiligen Schnittpunkten der Strecken zügig identifiziert werden. Anhand dieser Bilder an den jeweiligen Schnittpunkten der Viertelzahnstrecken erfolgte nun die eigentliche Vermessung. Gemessen wurde dann der Abstand vom Übergang des Zahnzement zum Zahnschmelz (cementoenamel junction; CEJ) bis zum Kamm des Alveolarknochens (alveolar bone crest; ABC, Abb. 4, B).

Hierzu wurde ein digitales Lineal an den Übergang vom Zahnzement zum Zahnschmelz gelegt und die Distanz bis zum Kamm des Alveolarknochens in Millimeter (mm) abgelesen. Die Messwerte pro Tier wurden so gruppenweise ermittelt und der Durchschnitt errechnet.

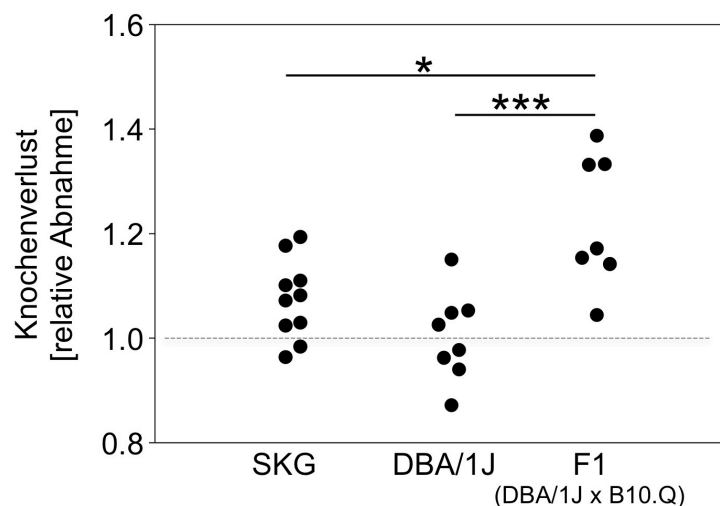
Die Zunahme der Distanz von CEJ zu ABC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle entspricht dem Abbau des Alveolarknochens. Zur Auswertung wurde hierzu ein Quotient gebildet, aus dem mittleren Abstand CEJ-ABC der mit Bakterien inokulierten Versuchsgruppen geteilt durch dem mittleren Abstand CEJ-ABC der sham-inokulierten Tiere. Die Ergebnisse entsprechen somit der relative Distanzzunahme CEJ-ABC. Diese Zunahme der gemessenen Distanz ist vermutlich bedingt durch den Abbau des Alveolarknochens.



**Abbildung 6: Vermessung eines Zahns des rechten Unterkiefers an einem vorher festgelegten Messpunkt.** Gemessen wurde die Distanz vom Übergang des Zahnzementes zum Zahnschmelz (cementoenamel junction, CEJ) bis zum Kamm des Alveolarknochens (alveolar bone crest, ABC). **A** Übersicht des zu vermessenden Zahns in der Coronarebene. **B** Darstellung der zu vermessenden Distanz. Die Pfeile markieren die zu untersuchende Strecke.

#### 5.4 QUANTIFIZIERUNG DER PARODONTITIS IM VOREXPERIMENT

Es erfolgte zunächst ein Vergleichsexperiment mehrerer Mausstämme zur Identifizierung eines vulnerablen Mausstammes, in dem eine Induktion einer Parodontitis durch orale Inokulationen mit Bakterien zuverlässig möglich ist. Jedes Tier erhielt insgesamt 8 Mal eine orale Inokulation. Alle Tiere erhielten bei jeder Inokulation *P. gingivalis* in gleicher Bakteriendosierung. Nach Abschluss der Experimentierphase erfolgte bei jedem Tier eine microcomputertomographische Analyse der 3 Molaren des rechten Unterkiefers. Tiere der Kontrollgruppen blieben komplett unbehandelt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die oralen Inokulationen mit *Porphyromonas gingivalis* auf den DBA/1J-Stamm keinen Einfluss hat. Ein Knochenverlust konnte, im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden. Im Mittel betrug der relative Knochenverlust in der Interventionsgruppe im Verhältnis zur Kontrollgruppe das 0,989-fache, was einem sehr geringen Knochenaufbau entspricht. Dieser Unterschied ist jedoch nur minimal, sodass vermutlich nicht von einem wirklichen Knochenaufbau auszugehen ist, sondern diese Werte auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sind. Im Gegensatz zum DBA/1J-Stamm zeigte der SKG-Stamm einen Knochenverlust. Dieser betrug im Vergleich zur Kontrollgruppe den 1,076-fachen Knochenverlust und war im direkten Vergleich mit der DBA/1J-Gruppe statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).



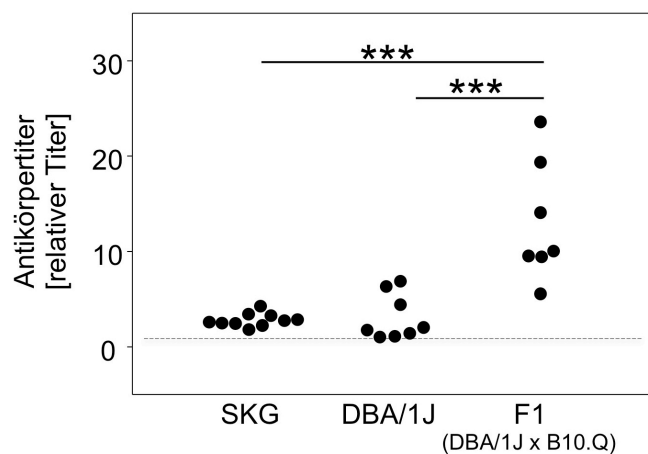
**Abbildung 7: Mäuse der F1 (DBA/1J x B10.Q) zeigten den stärksten Knochenverlust nach 8 oralen Inokulationen mit *P. gingivalis*.** Gemessen wurde der Abstand vom Übergang des Zahnzementes zum Zahnschmelz (CEJ) bis zum Kamm des Alveolarknochens (ABC) mittels  $\mu$ CT. Die Darstellung erfolgt als Quotient der gemessenen Strecke der mit *P. gingivalis* inokulierten Tiere geteilt durch die Strecke der unbehandelten Kontrollen. Das Ergebnis ist die relative Zunahme der gemessenen Distanz und entspricht dem alveolaren Knochenverlust. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier der jeweiligen Gruppe. Die gestrichelte Linie markiert einen Wert von 1, was einem unveränderten Knochenstatus entspricht. Gruppengröße: SKG n= 10, DBA/1J n= 8, F1 (DBA/1J x B10.Q) n= 7, jeweils 5 Kontrolltiere pro Gruppe. One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Die Ergebnisse legen nahe, dass tendenziell eine Parodontitis (mit einhergehendem Knochenabbau) ausgelöst wurde. Jedoch ist dieser relative Knochenverlust nur schwach ausgeprägt. Die F1 (DBA x B10.Q) zeigte den größten Effekt aller analysierten Stämme im Vorexperiment. Insgesamt wurde ein 1,238-facher Knochenverlust in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt. Der direkte Vergleich sowohl mit dem SKG-Stamm ( $p < 0,001$ ) als auch mit dem DBA/1J-Stamm ( $p < 0,001$ ) zeigte in der statistischen Analyse hochsignifikante Unterschiede.

Zusammenfassend wurde bei der Auswertung der größte Knochenverlust und damit die schwerste symptomatische Parodontitis bei den Versuchstieren der F1 (DBA x B10.Q) beobachtet. Aufgrund der hier beobachteten Vulnerabilität zur Induktion einer experimentellen Parodontitis, wurde das Anschlussexperiment nachfolgend ausschließlich mit der F1 (DBA/1J x B10.Q) durchgeführt.

## 5.5 ANALYSE DER ANTIKÖRPERTITER GEGEN *P. GINGIVALIS* IM VOREXPERIMENT

Um zu ermitteln, warum bei der F1 (DBA/1J x B10.Q) der microcomputertomographisch gemessene Effekt der induzierten Parodontitis deutlich größer war als bei den anderen beiden untersuchten Stämmen, wurde eine Antikörperdiagnostik im Serum nach Euthanisierung durchgeführt. Hierbei wurden die IgG Antikörpertiter gegen *P. gingivalis* mittels ELISA gemessen. Als Kontrollen diente das Serum der unbehandelten Kontrolltiergruppe.



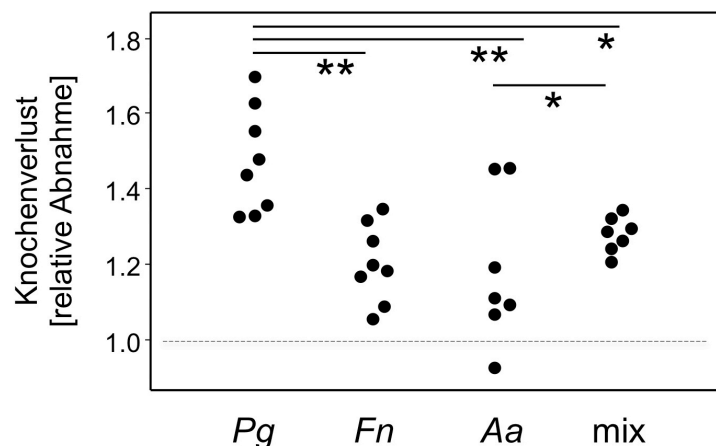
**Abbildung 8:** Versuchstiere der F1 (DBA/1J x B10.Q) zeigten die höchsten IgG Serumantikörpertiter gegen *P. gingivalis*. Gemessen wurden die Serumantikörpertiter gegen *P. gingivalis* mittels ELISA. Die Darstellung erfolgt als relative Titerhöhe, wobei die unbehandelten Kontrollen den Hintergrund stellen. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier der jeweiligen Gruppe. Gruppengröße: SKG n= 10, DBA/1J n= 8, F1 (DBA/1J x B10.Q) n= 7, jeweils 5 Kontrolltiere pro Gruppe. One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Ziel war es, zu bestätigen, dass die Tiere des SKG und DBA/1J-Stammes, die bei der Quantifizierung der Parodontitis mittels  $\mu$ CT nur milde parodontitische Effekte zeigten, Kontakt mit den inokulierten Bakterien hatten. Es konnte festgestellt werden, dass die Antikörpertiter im Verhältnis zu den jeweiligen Kontrollgruppen sowohl bei den Tieren des SKG-Stammes als auch bei den Tieren des DBA/1J-Stammes insgesamt gering ausgeprägt, aber dennoch im Vergleich zu den Kontrollgruppen erhöht waren. Dies spricht für eine erfolgreiche Infektion der Tiere. Die relative mittlere Höhe der Antikörpertiter betrug für den SKG-Stamm 2,727 und für den DBA/1J-Stamm 3,038. Ein Vergleich der Werte der SKG- und DBA/1J-Gruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Anders verhielt es sich bei den Tieren der F1 (DBA/1J x B10.Q). Der mittlere relative Antikörpertiter betrug 12,996. Der direkt Vergleich mit den Werten der SKG und DBA/1J Gruppe zeigte je hochsignifikanten Unterschiede (beide  $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend konnten bei allen Versuchstiergruppen erhöhte Antikörpertiter gegen *P. gingivalis* nachgewiesen werden im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen. Dies spricht für erfolgreiche Inokulationen der Tiere mit dem Bakterium.

## 5.6 QUANTIFIZIERUNG DER PARODONTITIS IM HAUPTEXPERIMENT

Im Hauptexperiment erfolgten die oralen Inokulationen entweder gruppenweise mit *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* oder als Bakterienmix, wobei alle drei Bakterien zusammen appliziert wurden.



**Abbildung 9: Mäuse, die mit *P. gingivalis* alleine inokuliert wurden, zeigten den stärksten Knochenverlust aller behandelten Gruppen.** Gemessen wurde der Abstand vom Übergang des Zahnzementes zum Zahnschmelz bis zum Kamm des Alveolarknochens mittels  $\mu$ CT. Die Darstellung erfolgt als Quotient der gemessenen Strecke der mit *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* oder allen drei Bakterien in Kombination inokulierten Tiere geteilt durch die Strecke der sham-inokulierten Kontrollen. Das Ergebnis ist die relative Zunahme der gemessenen Distanz und entspricht dem alveolaren Knochenverlust. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier der jeweiligen Gruppe. Die gestrichelte Linie markiert einen Wert von 1, was einem unveränderten Alveolarknochenstatus entspricht. Gruppengrößen: Pg n= 8, Fn n= 8, Aa n=7, Mi n=7, sham n=9. Pg *Porphyromonas gingivalis*, Fn *Fusobacterium nucleatum*, Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mix Kombination aus Pg + Fn + Aa. One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

Als Kontrolle dienten sham-inokulierte Tiere, die anstelle der Bakterien PBS unter Zusatz von Carboxymethylcellulose (CMC) erhielten. Gemessen wurde, wie schon im Vorexperiment der Abstand CEJ-ABC mittels  $\mu$ CT. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Quotient der gemessenen Strecke der mit *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* oder allen drei Bakterien in Kombination inokulierten Tiere geteilt durch die Strecke der sham-inokulierten Kontrollen. Das Ergebnis ist die relative Zunahme der gemessenen Distanz und entspricht dem alveolaren Knochenverlust. Der geringste relative Knochenverlust wurde in den Gruppen verzeichnet, die mit *A. actinomycetemcomitans* oder *F. nucleatum* inokuliert wurde. Bei diesen Gruppen wurde ein 1,087-facher (*Aa*) und ein 1,096-facher (*Fn*) Knochenverlust im Vergleich zur sham-inokulierten Versuchstiergruppe gemessen. Ein deutlich stärkerer Knochenverlust wurde bei den Tieren gemessen, die mit der Bakterienkombination aus allen drei Bakterien (*Pg* + *Fn* + *Aa*) inokuliert wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde ein 1,173-facher Knochenverlust verzeichnet. Die statistische Analyse zeigte hierzu signifikante Unterschiede zu den Gruppen, die nur mit *A. actinomycetemcomitans* ( $p < 0,05$ ) oder *P. gingivalis* ( $p < 0,05$ ) inokuliert wurden. Der insgesamt größte relative Knochenverlust (1,354-fache) wurde bei den Tieren gemessen, die mit *P. gingivalis* alleine inokuliert wurden. Die Unterschiede der *Pg*-Gruppe zu allen anderen Versuchsgruppen waren stets statistisch signifikant.

Zusammenfassend wurden die größten Parodontitis induzierten Effekte bei den Tieren beobachtet, die mit *P. gingivalis* alleine inokuliert wurden. Überraschenderweise waren die Effekte des Bakterienmixes auf den Alveolarknochen nur mäßig ausgeprägt und mit den Effekten der Inokulationen mit den einzelnen Bakterien *F. nucleatum* oder *A. actinomycetemcomitans* vergleichbar.

## **5.7 QUANTIFIZIERUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS**

---

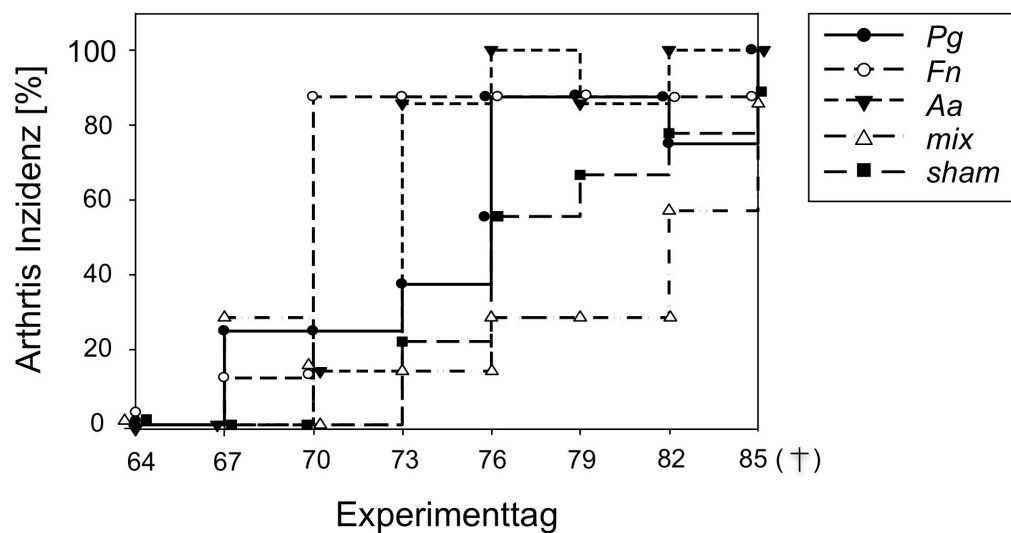
Nach durchgeführter Sekundärimmunisierung der CIA der Tiere an Experimenttag 63 erfolgte die regelmäßige Quantifizierung der arthritischen Symptome. Hierzu wurden die Extremitäten der jeweiligen Tiere alle drei Tage visuell untersucht, beginnend drei Tage nach der Sekundärimmunisierung. Es wurde pro Extremität ein Punktwert erhoben und die Summe wurde pro Tier pro Tag notiert und der Mittelwert gruppenweise ermittelt. Die Punkteskala reichte pro Tier pro Tag von 0 Punkten (keine Arthritis) bis maximal 60 Punkte (volle Arthritis an allen 4 Extremitäten). Die letzte Untersuchung auf arthritische Symptome wurde kurz vor der zervikalen Dislokation durchgeführt. Die Quantifizierung der Arthritis erfolgte durch Vergleich des Schweregrads (anhand des Scores) der verschiedenen Versuchstiergruppen an Tag 85 und durch Vergleich der Inzidenzen über den



Group	Arthritis Score [Punkte]
<i>Pg</i>	6, 6, 6, 6, 6, 6, 6, 11, 21, 26
<i>Fn</i>	1, 6, 6, 11, 11, 16, 16, 36
<i>Aa</i>	6, 11, 11, 21, 26, 26, 51
mix	11, 11, 11, 16, 16, 16, 16
sham	11, 11, 11, 11, 11, 11, 16, 21, 21

42

Allerdings war die mittlere Inzidenz der kollagen-induzierten Arthritis in diesem Experiment sehr hoch. Am Schluss des Experimentes betrug die Inzidenz aller Tiergruppen zwischen 85,7-100%. Die kumulative Inzidenz am Ende der Beobachtungsphase der einzelnen Versuchsgruppen betrug 85,7 % in der mit dem Bakterienmix inokulierten Gruppe, 87,5 % in der *F. nucleatum* inokulierten Gruppe und 88,9 % in der sham-inokulierten Versuchstiergruppe. Für die Versuchstiergruppen, die orale Inokulationen mit *P. gingivalis* oder *A. actinomycetemcomitans* erhalten haben, betrug die Inzidenz jeweils 100 %. Es wurden Unterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit der Entwicklung der Kollagen-induzierten Arthritis verzeichnet. Versuchstiere, die mit dem Bakterienmix aus *P. gingivalis*, *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* inokuliert wurden, zeigten den langsamsten Anstieg der Inzidenz über die Zeit. Im Gegensatz dazu wurde in den Gruppen, die entweder mit *F. nucleatum* oder *A. actinomycetemcomitans* inokuliert wurden, der jeweils schnellste Anstieg der Inzidenz gemessen. Ein Log Rank (Mantel-Cox) Test wurde durchgeführt, um die verschiedenen Entwicklungsgeschwindigkeiten in der späten Experimentphase zu vergleichen. Hierbei zeigte sich zwar ein Unterschied, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,061$ ). Im Gegensatz dazu zeigten durchgeführte Breslow- (generalisierter Wilcoxon) und Tarone-Ware Tests, die die frühe bzw. mittlere Experimentphase vergleichen, statistisch signifikante Unterschiede ( $p$ -Werte: 0,034 und 0,039).

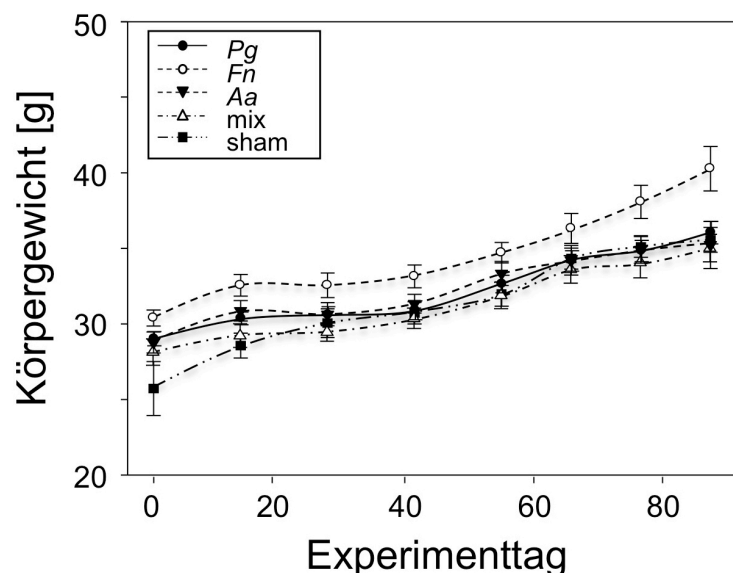


**Abbildung 12: Tiere, die mit *F. nucleatum* oder *A. actinomycetemcomitans* inokuliert wurden, zeigten den schnellsten Anstieg der Inzidenz.** Gemessen wurde die Inzidenz von arthritischen Symptomen, beginnend einen Tag nach der Sekundärimmunisierung der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) ab Tag 64 bis zum Zeitpunkt der Euthanasierung an Experimenttag 85 (Kreuz). Gruppengröße: Pg n= 8, Fn n= 8, Aa n=7, Mi n=7, sham n=9. Abkürzungen Pg *Porphyromonas gingivalis*, Fn *Fusobacterium nucleatum*, Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mix Kombination aus Pg + Fn + Aa. Statistische Tests zum Vergleich der unterschiedlichen Entwicklungen von CIA-Symptomen im Verlauf: Breslow-Test (generalisierter Wilcoxon) zur Analyse der frühen Entwicklungsphase. Tarone-Ware Test zur Analyse der mittleren Beobachtungsphase. Log Rank (Mantel-Cox) Test zum Vergleich späten Experimentphase.

Zusammenfassend konnte bei der Quantifizierung der Kollagen-induzierten Arthritis hinsichtlich der symptomatischen Schwere anhand des verwendeten makroskopischen Scores keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen an Experimenttag 85 beobachtet werden. Allerdings wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen gefunden hinsichtlich der gruppenspezifischen Inzidenz. Tiere, die mit *F. nucleatum* oder *A. actinomycetemcomitans* inokuliert wurden, zeigten den schnellsten Anstieg der Inzidenz, während Tiere die mit dem Bakterienmix inokuliert wurden, den langsamsten Anstieg der Inzidenz zeigten.

## 5.8 KÖRPERGEWICHT

Um sicherzugehen, dass die Tiere sich während des Hauptexperimentes adäquat entwickeln, wurde das Körpergewicht kontinuierlich gemessen. Die erste Gewichtskontrolle erfolgte am ersten Experimenttag. Die letzte Messung wurde kurz vor Euthanisierung durchgeführt. Das mittlere Körpergewicht der mit *P. gingivalis* inokulierten Versuchstiergruppe lag am ersten Experimenttag bei 29,1 g. Das Körpergewicht zum Ende der Experimentphase der Gruppe betrug 36,1 g kurz vor Euthanisierung. Die relative Gewichtszunahme im Verlauf des Experiments ergab somit + 24,2 %.



**Abbildung 13: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der relativen Körpergewichtszunahme im Verlauf des Hauptexperimentes.** Gemessen wurde das Körpergewicht jeder Maus an jedem zweiten Tag, beginnend an Experimenttag 1 bis zur letzten Inokulation der Bakterien an Experimenttag 26. Danach erfolgte die Kontrolle des Körpergewichts alle drei Tage mittels einer Digitalwaage. Dargestellt ist der Verlauf des absoluten Körpergewichts der einzelnen Gruppen. Die Linien repräsentieren das arithmetische Mittel des Körpergewichts der jeweiligen Versuchsgruppe. Der Übersichtlichkeit geschuldet, sind nur einige Messpunkte eingezeichnet. Horizontale Linien entsprechen der Darstellung des Standardfehlers. Gruppengröße: Pg n= 8, Fn n= 8, Aa n=7, Mi n=7, sham n=9. Abkürzungen: Pg *Porphyromonas gingivalis*, Fn *Fusobacterium nucleatum*, Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mix Kombination aus Pg + Fn + Aa. ANOVA: keine gruppenspezifischen Unterschiede hinsichtlich der relativen Zunahme des Körpergewichts



Das mittlere Anfangsgewicht der mit *F. nucleatum* inokulierten Tiere lag an Tag 1 bei 30,5 g und das Endgewicht an Tag 85 bei 40,3 g. Die relative Gewichtszunahme ergab + 32,4 %. Die mit *A. actinomycetemcomitans* inokulierten Versuchstiere wurden mit einem mittleren Gewicht von 28,8 g in das Experiment eingeschlossen. Das Endgewicht lag bei 35,2 g. Die relative Gewichtszunahme ergab somit + 22,4 %. Die Tiere, die mit dem Bakterienmix inokuliert wurden, begannen das Experiment mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 28,2 g. Das Endgewicht lag bei 35,1 g. Die relative Gewichtszunahme betrug + 24,4 %. Das Körpergewicht der sham-inokuliert Tiere zu Beginn lag bei durchschnittlich 25,7 g. Dies war das geringste mittlere Körpergewicht aller Versuchsgruppen am ersten Experimenttag. Auffällig war, dass dieses niedrige mittlere Körpergewicht der Gruppe hervorgerufen wurde durch zwei Tiere, deren Körpergewicht mit 18,7 g und 18,9 g deutlich unter dem Durchschnitt aller anderen Tiere in der Versuchsgruppe lag. Interessanterweise zeigte sich bei eingehender Analyse, dass diese beiden Tiere aus einem Wurf stammten. Das Endgewicht der Versuchsgruppe lag bei 35,6 g. Die relative Zunahme des Körpergewichts der Versuchsgruppe im Verlauf lag somit bei 38,3 %. Von allen Versuchstieren war dies die größte relative Gewichtszunahme. Von den bereits erwähnten beiden Tieren mit deutlich niedrigerem Anfangsgewicht entwickelte sich ein Tier normal, dessen Körpergewicht an Experimenttag 85 bei 37,1 g lag (relative Gewichtszunahme: + 96,3 %). Das andere Tier zeigte eine geringere Zunahme des Körpergewichts. Am Ende des Experiments lag dessen absolutes Körpergewicht mit 30,7 g (relative Gewichtszunahme: + 64,1 %) unter dem Gruppendurchschnitt. Die statistische Analyse der relativen Gewichtszunahme mittels ANOVA zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

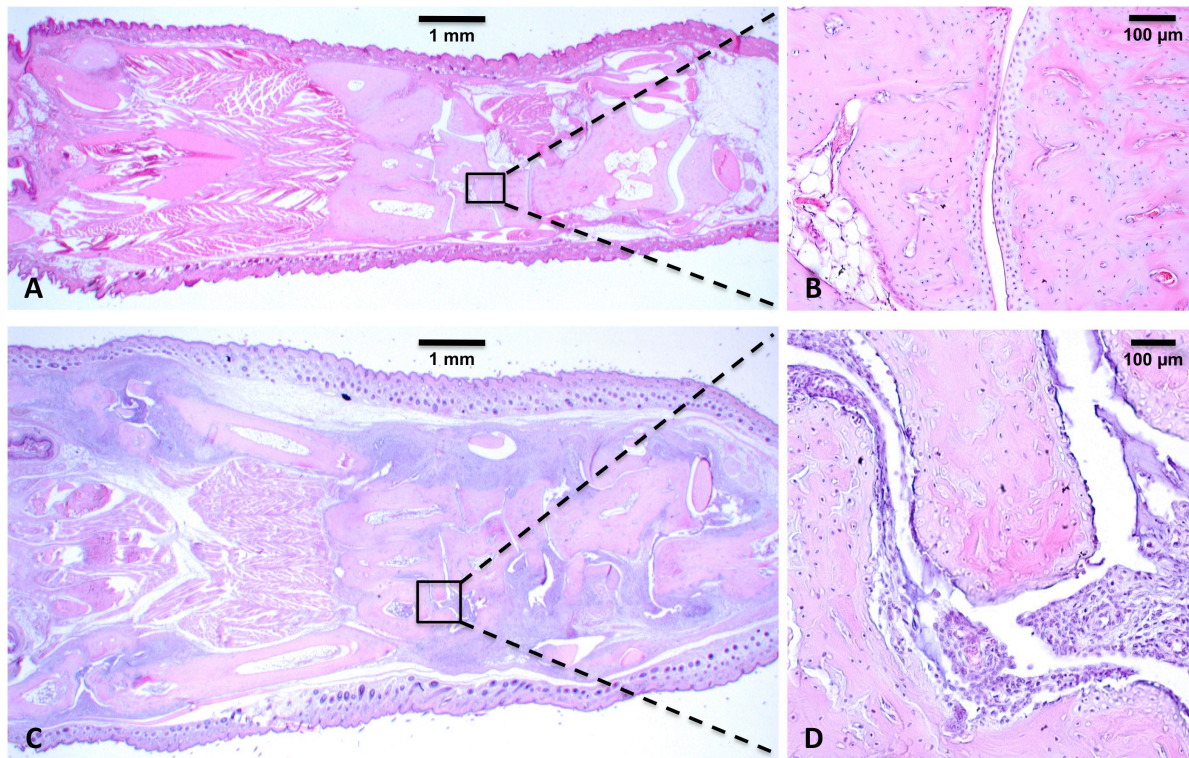
Zusammenfassend nahmen alle Versuchstiere im Verlauf des Hauptexperimentes an Körpergewicht zu. Sowohl zu Beginn, im Verlauf, als auch am Ende des Experiments konnten keine gruppenspezifischen Effekte nachgewiesen werden. Die vergleichende Analyse der Gruppen hinsichtlich der relativen Gewichtszunahme zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede.

## **5.9 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG**

---

Zur Verifikation einer lokalen Entzündungsreaktion wurde die histologische Untersuchung der Extremitäten durchgeführt. Hierzu wurde anhand des makroskopischen Arthritis-Scores die durchschnittlich bei allen Tiere im gesamten Hauptexperiment am häufigsten und am stärksten entzündete Extremität identifiziert. Es stellte sich heraus, dass bei sämtlichen Tieren der rechte Hinterlauf im Mittel am häufigsten und am stärksten von arthritischen Symptomen betroffen war, sodass nachfolgend nur der rechte Hinterlauf histologisch untersucht wurden. Es stellte sich allerdings bereits bei den ersten angefertigten histologischen Schnitten heraus, dass es schwierig war, das Ausmaß der Entzündung

histologisch zu quantifizieren. Aufgrund der fraglichen Vergleichbarkeit wurde auf eine dezidierte histologische Analyse verzichtet. Allerdings sind einige Bilder exemplarisch in dieser Arbeit abgebildet.

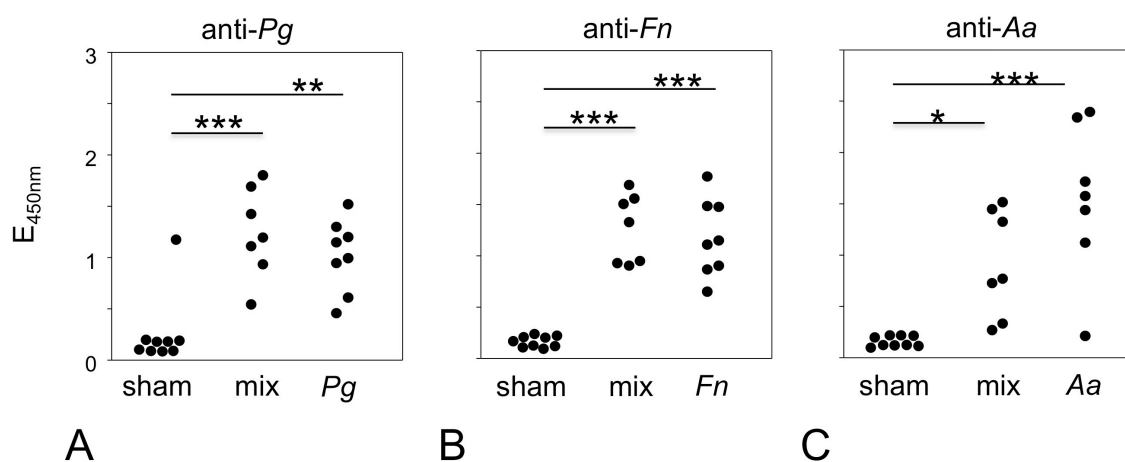


**Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der histologischen Untersuchung der Hinterläufe.** A,B Histologie eines asymptomatischen rechten Hinterlaufes. C,D Histologie eines symptomatischen rechten Hinterlaufes. Darstellung in 12,5 x (links) und 200 x (rechts) Vergrößerung.

## 5.10 ANALYSE DER ANTIBAKTERIELLEN ANTIKÖRPERTITER IM HAUPTEXPERIMENT

Analog zum Vorexperiment wurde nach der abgeschlossenen Hauptexperimentphase kurz vor zervikaler Dislokation der retrobulbäre Venenplexus der Tiere punktiert und Blut gewonnen, das anschließend auf verschiedene Faktoren untersucht wurde. Es erfolgte zunächst die Quantifizierung der antibakteriellen IgG Serumantikörper gegen *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Ziel dabei war es indirekt zu ermitteln, ob die Applikation des Bakterienmixes zu verdrängendem Wachstum eines Bakteriums und nachfolgendem unterdrückten Wachstum eines anderen Bakteriums führt oder ob sich die inokulierten Bakterien synergistisch zueinander verhalten. Die Analyse mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zunächst wurde

die Transmission gemessen und die Extinktion bestimmt. Bei der Analyse der IgG Antikörper gegen *P. gingivalis* zeigte sich bei der mit dem Bakterienmix inokulierten Versuchstiergruppe der höchste mittlere Serumantikörpertiter. Die durchschnittliche mittlere Extinktion lag bei 1,237, gefolgt von einer Extinktion von 1,014 in der Gruppe, die ausschließlich mit *Pg* inokuliert wurden. Die niedrigsten Antikörpertiter fanden sich in der sham-inokulierten Gruppe. Die mittlere Extinktion betrug 0,234. Die statistische Analyse zeigte hierbei signifikante Unterschiede zwischen den sham-inokulierten Tiere und den Tiere, die mit dem Bakterienmix ( $p < 0,001$ ) oder *Pg* ( $p < 0,01$ ) alleine inokuliert wurden. Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen den mit Bakterienmix inokulierten Tiere und ausschließlich mit *Pg* inokulierten Tieren gefunden ( $p > 0,05$ ). Ähnliches zeigte sich bei der Analyse der Antikörpertiter gegen *F. nucleatum*. Die Extinktion war am höchsten in der mit dem Bakterienmix inokulierten Gruppe (1,259), gefolgt von der Versuchstiergruppe, die ausschließlich mit *Fn* inokuliert wurden (1,170). Die niedrigsten Antikörpertiter fanden sich in der sham-inokulierten Gruppe (0,133). Die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede zwischen den sham-inokulierten Tiere und den Gruppe, die mit dem Bakterienmix ( $p < 0,001$ ) oder *Fn* alleine inokuliert wurden ( $p < 0,001$ ). Kein Unterschied wurden zwischen den mit Bakterienmix inokulierten Tieren und den Tieren, die nur mit *Fn* inokuliert wurden, gefunden ( $p > 0,05$ ). Auch bei der Quantifizierung der Antikörpertiter gegen *A. actinomycetemcomitans* wurden die höchsten Extinktionswerte in den mit dem Bakterienmix (0,897) oder nur mit *Aa* (1,529) inokulierten Gruppen festgestellt.



**Abbildung 15: Alle Versuchstiergruppen, die mit Bakterien inokuliert wurden, zeigten erhöhte antibakterielle Antikörpertiter.** Gemessen wurden die IgG Serumantikörpertiter gegen *P. gingivalis* (anti-Pg), *F. nucleatum* (anti-Fn) und *A. actinomycetemcomitans* (anti-Aa) mittels ELISA an Experimenttag 85. Dargestellt ist die Extinktion als dimensionslose Zahl. Jeder Punkt entspricht einem Versuchstier. E Extinktionsrate bei 450 nm. Gruppengröße: *Pg* n= 8, *Fn* n= 8, *Aa* n=7, *Mi* n=7, sham n=9. Die Auswertung erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung. One-way ANOVA: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

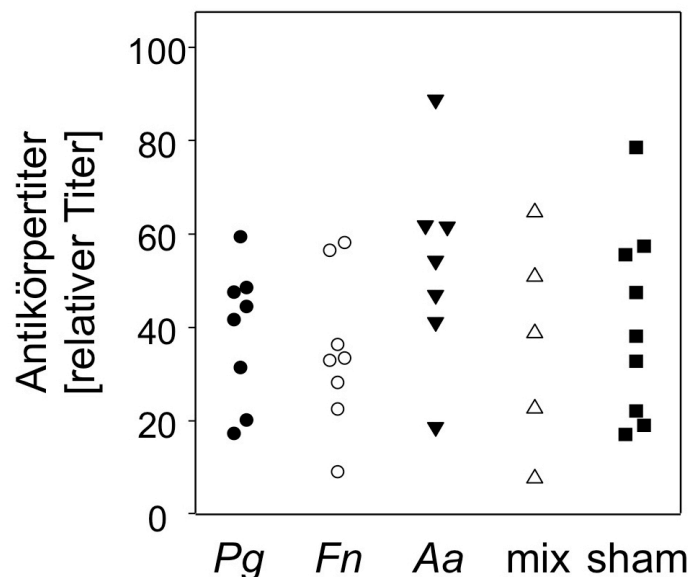
Die niedrigsten Antikörpertiter zeigten die Tiere der sham-inokulierten Gruppe (0,102). Signifikante Unterschiede fanden sich im direkten Vergleich zwischen der sham-inokulierten Gruppe und den Gruppen, die mit dem Bakterienmix ( $p < 0,05$ ) oder nur mit *Aa* inokuliert wurden ( $p < 0,001$ ). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Quantifizierung von anti-*Pg* und anti-*Fn* Antikörpern, zeigten sich jedoch hier die höchsten Antikörpertiter in der Gruppe die ausschließlich mit *Aa* (anti-*Aa*) inokuliert wurden und nicht in der Gruppe, die mit dem Bakterienmix inokuliert wurden. Der direkte Vergleich dieser beiden Gruppen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass alle Tiere, die mit Bakterien inokuliert wurden, jeweils erhöhte bakterienspezifische Antikörpertiter aufwiesen, während die sham-inokulierten Tiere nur sehr geringe antibakterielle Antikörpertiter aufwiesen. Diese beobachteten Unterschiede waren im direkten Gruppenvergleich stets statistisch signifikant. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Höhe der Antikörpertiter zwischen den Versuchstiergruppen gefunden, die mit dem Bakterienmix oder jeweils mit *Pg*, *Fn* oder *Aa* alleine inokuliert wurden.

### 5.11 ANALYSE DER ANTIKÖRPER GEGEN BOVINES UND MURINES KOLLAGEN TYP II

Ziel der Quantifizierung der IgG Antikörper gegen bovines Kollagen Typ II war es, festzustellen, ob die verschiedenen applizierten oralen Pathogene Einfluss auf die Entwicklung dieser Antikörpern in Zusammenhang mit der Kollagen-induzierten Arthritis haben. Dies war auch Ziel der Analyse von IgG Antikörpern gegen murines Kollagen Typ II. Speziell hierbei interessierte es ob es zu einer Kreuzreaktion zwischen anti-bovinen und anti-murinen Antikörper im Sinne eines molekularen Mimicry kommt und ob dieser Zustand durch bestimmte Bakterien beeinflusst wird. Die durchgeführten Analysen erfolgten gruppenweise in Zweifachbestimmung. Als Kontrollen dienten die Seren der Kontrolltiere aus dem Vorexperiment, die keine Intervention erfahren haben. Die abgebildeten Daten stellen die relative Höhe der Antikörper dar, wobei die unbehandelten Kontrollen den Hintergrund darstellen.

Der niedrigste mittlere Antikörpertiter wurde in der Gruppe festgestellt, die nur mit *Fn* inokuliert wurden (relativer Titer 34,5). Der höchste mittlere Antikörpertiter fand sich bei den Tieren, die mit *Aa* inokuliert wurden (relativer Titer 53,3). Für die restlichen Versuchsgruppen betrugen die mittleren relativen Titer die Werte 36,8 (*mix*), 38,6 (*Pg*) und 40,9 (*sham*).

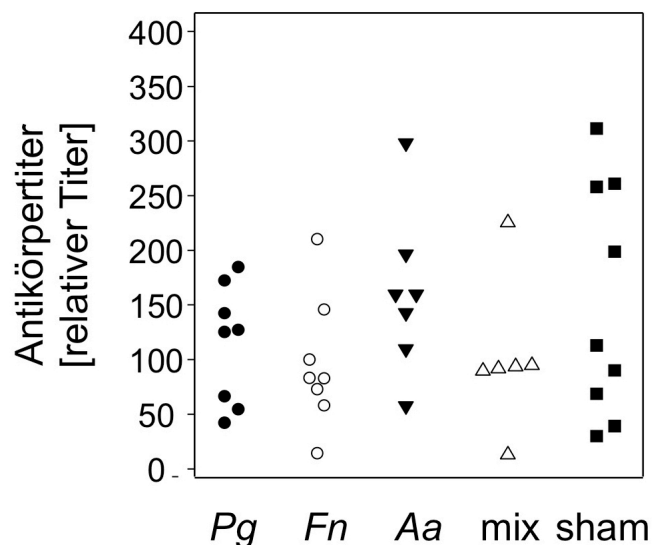


**Abbildung 16:** Alle Versuchstiergruppen zeigten am Ende des Experiments vergleichbare Serumantikörpertiter gegen bovines Kollagen Typ II. Es erfolgte die semiquantitative Messung der IgG Serumantikörpertiter gegen bovines Kollagen Typ II mittels ELISA an Experimenttag 85. Die Darstellung erfolgt als relative Titerhöhe, wobei die Seren der unbehandelten Kontrollen aus dem Vorexperiment den Hintergrund darstellen. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Gruppengröße: *Pg* n= 8, *Fn* n= 8, *Aa* n=7, *Mi* n=7, *sham* n=9. *Pg* *Porphyromonas gingivalis*, *Fn* *Fusobacterium nucleatum*, *Aa* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *mix* Kombination aus *Pg* + *Fn* + *Aa*, n= 5 unbehandelte Kontrollen pro Gruppe. One-way ANOVA: keine gruppenspezifischen Unterschiede.

Ein durchgeführter ANOVA-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer relativen Antikörpertiter.

Bei der Analyse der Antikörpertiter gegen murines Kollagen Typ II fanden sich die niedrigsten mittleren Antikörpertiter bei den Tieren, die mit *Fn* inokuliert wurden (relativer Titer 95,1). Der höchste Antikörpertiter fand sich bei den Tieren, die mit *Aa* inokuliert wurden (relativer Titer 160,5). Die Werte der Titer der anderen Versuchsgruppen betrugen 101,3 (mix), 113,6 (*Pg*) und 152,2 (sham). Zwischen den einzelnen Gruppen konnten mittels ANOVA-Test keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Zusammenfassend wurde die semiquantitative Serumanalyse der Antikörpertiter gegen bovines und murines Kollagen Typ II durchgeführt. Hierbei konnten weder bei den Antikörpertitern gegen bovines Kollagen Typ II, als auch bei den Antikörpertitern gegen murines Kollagen Typ II statistisch signifikante gruppenspezifische Unterschiede gefunden werden.



**Abbildung 17: Alle Versuchstiergruppen zeigten vergleichbare Serumantikörpertiter gegen murines Kollagen Typ II.** Es erfolgte die semiquantitative Messung der IgG Serumantikörper gegen murines Kollagen Typ II mittels ELISA an Experimenttag 85. Die Darstellung erfolgt als relative Titerhöhe, wobei die Seren der unbehandelten Kontrollen aus dem Vorexperiment den Hintergrund darstellen. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Gruppengröße: *Pg* n= 8, *Fn* n= 8, *Aa* n=7, Mi n=7, sham n=9. *Pg* *Porphyromonas gingivalis*, *Fn* *Fusobacterium nucleatum*, *Aa* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mix Kombination aus *Pg* + *Fn* + *Aa*, n= 5 unbehandelte Kontrollen pro Gruppe. One-way ANOVA: keine gruppenspezifischen Unterschiede.

## 5.12 ANALYSE DER INFLAMMATORISCHEN ZYTOKINE

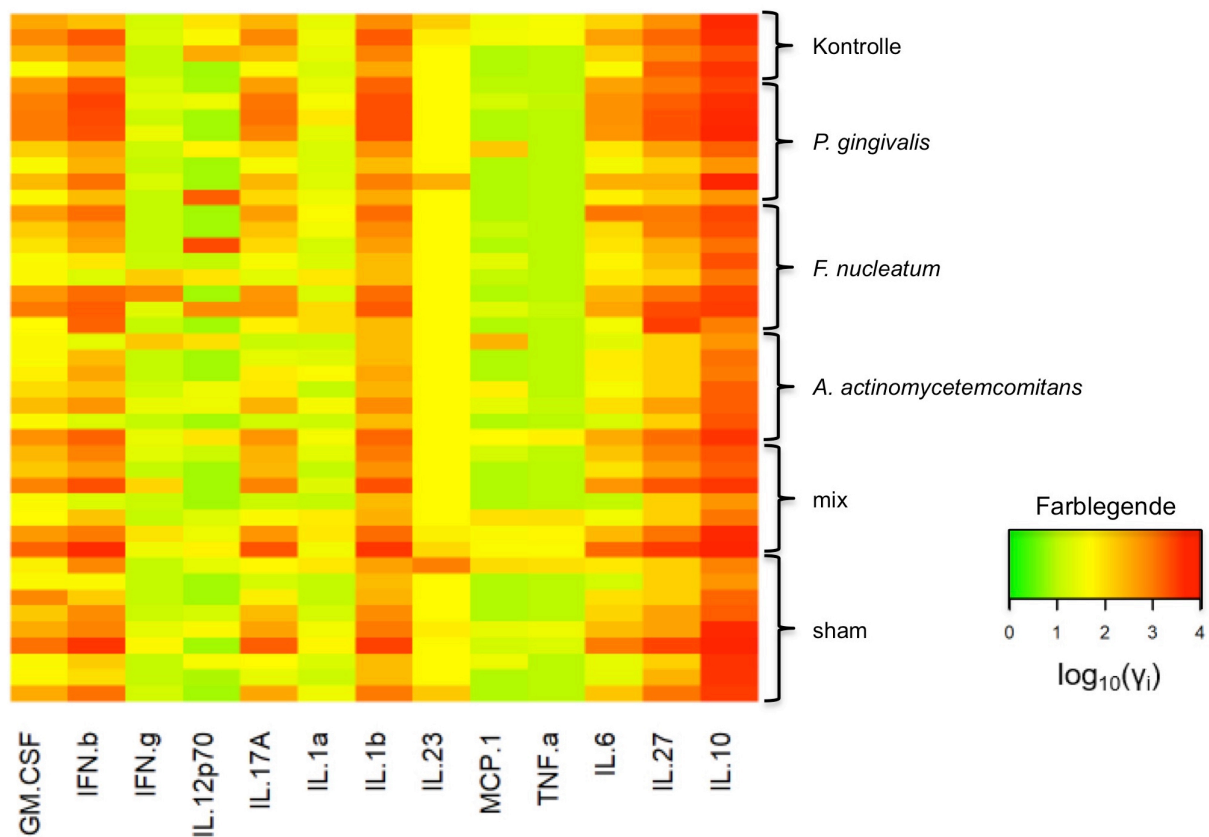
Verschiedene inflammatorische Marker im Serum wurden untersucht, um festzustellen, ob die oralen Inokulationen mit den Pathogenen, einen modulierenden Einfluss auf das Immunsystem der Tiere hatten und ob ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Ergebnissen der Inzidenz der Kollagen-induzierten Arthritis und den verschiedenen applizierten Bakterien bestand. Gemessen wurden die Zytokinespiegel von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, GM-CSF, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , MCP-1 und TNF $\alpha$  mittels Multiplexansatz. Die Auswertung erfolgte anschließend durchflusszytometrisch.

**Tabelle 9: Übersicht über die gemessenen inflammatorischen Marker im Serum**

Zytokine	Funktion
IL-1 $\alpha$	Proinflammatorisch, induziert generalisierte Entzündungsreaktion, Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagenaktivierung
IL-1 $\beta$	Proinflammatorisch, Anstieg der Neutrophilen, Thrombozyten, Fieber, T-Zell-Aktivierung,
IL-6	Proinflammatorisch, Aktivator der Akutphase Proteine, generalisierte Entzündungsreaktion, T- und B-Zell-Wachstum und Differenzierung, Fieber
IL-10	Antiinflammatorisch, hemmt Bildung von TNF, IL-1, IL-2, IL-6 und Makrophagen
IL-12p70	Proinflammatorisch, aktiviert NK-Zellen, induziert CD4-T-Zell Differenzierung in Th1-Zellen, Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität.
IL-17A	Proinflammatorisch, reguliert NF- $\kappa$ B, stimuliert Neutrophile
IL-23	Proinflammatorisch, induziert Th17-T-Zellen, stimuliert INF $\gamma$ -Produktion
IL-27	Antiinflammatorisch, frühe Th1-T-Zell Induktion, möglicherweise vor IL-12, Induziert IL-10
GM-CSF	Proinflammatorisch, Stimulation der Myelopoese und Funktion myeloischer Zellen, Mobilisierung von Stammzellen
IFN $\beta$	antiviral, antiproliferativ, antitumoral und immunmodulierend, erhöht MHC-I
IFN $\gamma$	Proinflammatorisch, aktiviert Makrophagen, erhöht MHC-II
MCP-1	chemotaktisch auf Monozyten, Basophile, Granulozyten, antitumoral
TNF $\alpha$	Proinflammatorisches Zytokin, antitumoral

Der Großteil der hier untersuchten Zytokine wird vom angeborenen Immunsystem produziert und dient als Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Die einzelnen Funktionen der Zytokine sind in Tabelle 9 dargestellt. Als Kontrollen diente das Serum der Kontrolltiere aus dem Vorexperiment, die keine Intervention erfahren haben. Die dargestellten Daten entsprechen der Massenkonzentration der Zytokine im Serum (pg/ml).

Alle Versuchsgruppen zeigten am Ende des Beobachtungszeitraumes vergleichbare Zytokinspiegel. Auch im direkten Vergleich mit Seren der unbehandelten Kontrolltieren zeigten sich keine gruppenspezifischen Unterschiede. Die gemessenen Ergebnisse der Quantifizierung der Entzündungsmarker sind als Heatmap dargestellt. Eine durchgeführte hierarchische Clusteranalyse zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen.

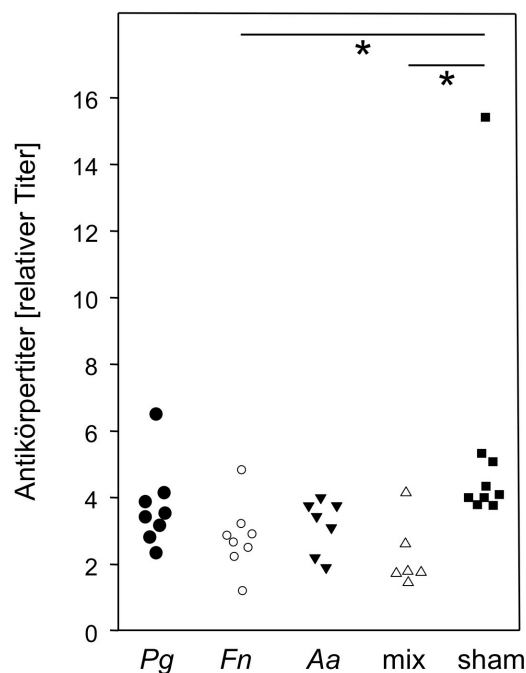


**Abbildung 18: Alle Versuchsgruppen zeigten am Ende des Beobachtungszeitraumes vergleichbare Zytokinspiegel.** Gemessen wurde die Massekonzentration der inflammatorischen Zytokine im Serum als Surrogatmarker zur Quantifizierung einer möglichen Entzündungsreaktion auf die oralen Inokulationen mit den Bakterien und die Kollagen-induzierten Arthritis. Die abgebildete Farbskala zeigt die Massekonzentration der Zytokine im Serum als dekadischer Logarithmus in (pg/ml). Als Kontrollen dient das Serum der unbehandelten Kontrolltiere aus dem Vorexperiment. Gruppengröße: *Pg* n= 8, *Fn* n= 8, *Aa* n=7, *Mi* n=7, sham n=9. *Pg* *Porphyromonas gingivalis*, *Fn* *Fusobacterium nucleatum*, *Aa* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mix Kombination aus *Pg* + *Fn* + *Aa*, n= 5 unbehandelte Kontrollen. Hierarchische Clusteranalyse: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



### 5.13 ANALYSE DER ANTIKÖRPER GEGEN CYKLISCHE CITRULLINIERTE PROTEINE (ANTI-CCP)

In der Routinediagnostik der rheumatoiden Arthritis im klinischen Alltag spielen die Antikörper gegen cyclische citrullinierte Proteine (anti-CCP) eine entscheidende Rolle. Cyclische citrullinierte Peptiden 2 (CCP2) und das mutierte citrullinierte Vimentin (MCV) dienen bei der Bestimmung der Antikörper als Antigen. In diesem Experiment erfolgte die Analyse der IgG Antikörpertiter im Serum der Versuchstiere mittels ELISA in Zweifachauswertung. Ziel dabei war es festzustellen, ob die oralen Inokulationen mit verschiedenen Bakterien und die nachfolgende Kollagen-induzierte Arthritis zu veränderten Antikörpertitern gegen cyclische citrullinierte Proteine führt – ganz im Sinne einer Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis. Als Kontrollen dienten die Seren der Kontrolltiere aus dem Vorexperiment, die keinerlei Intervention erfahren haben. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als relative Antikörpertiter, wobei die unbehandelten Kontrollen den Hintergrund darstellen.



**Abbildung 19: Alle Versuchsgruppen zeigten am Ende der Beobachtungsphase vergleichbare Antikörpertiter gegen cyclische citrullinierte Proteine (anti-CCP).** Es erfolgte die semiquantitative Bestimmung der IgG Serumantikörpertiter gegen cyclische citrullinierte Protein (anti-CCP) mittels ELISA. Die Darstellung erfolgt relativer Antikörpertiter, wobei die unbehandelten Kontrollen aus dem Vorexperiment den Hintergrund bilden. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Gruppengröße: Pg n= 8, Fn n= 8, Aa n=7, Mi n=7, sham n=9. Pg *Porphyromonas gingivalis*, Fn *Fusobacterium nucleatum*, Aa *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, mix Kombination aus Pg + Fn + Aa, n= 5 unbehandelte Kontrollen pro Gruppe. One-way ANOVA mit Dunn's Post-hoc-Test: \* p <0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\* p <0,001

Der niedrigste mittlere Antikörpertiter fand sich bei Tieren, die mit dem Bakterienmix inokuliert wurden (relativer Titer 2,25). Der höchste Antikörperanstieg fand sich bei Tieren, die sham-inokuliert wurden (relativer Titer 5,5). Für die Tiere, die mit *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* behandelt wurden, fanden sich relative Titer in Höhe von 2,8 (*Fn*), 3,1 (*Aa*) und 3,7 (*Pg*). Die durchgeführte statistische Analyse mittels One-way ANOVA on ranks zeigte signifikante Unterschiede zwischen sham-inokulierten Tieren und Tieren die mit *Fn* alleine ( $p < 0,05$ ) oder mit dem Bakterienmix ( $p < 0,05$ ) inokuliert wurden. Diese statistische Signifikanz ist allerdings kritisch zu bewerten, da in der sham-inokulierten Versuchstiergruppe ein Wert (15,4) gemessen wurde, der weit über dem Gruppendurchschnitt von 5,5 liegt.

Zusammenfassend konnten bei der semiquantitativen Analyse der Serumantikörper gegen zyklische citrullinierte Protein (anti-CCP) keine gruppenspezifischen Unterschiede gemessen werden. Alle Versuchsgruppen zeigten am Ende der Beobachtungsphase einen vergleichbaren Antikörpertiter. Die rechnerisch ermittelten signifikanten Unterschiede sind durch einen Ausreißer bedingt und daher eher als Zufall zu werten.

## VI. DISKUSSION

---

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, zunächst ein Tiermodell zu etablieren, in dem eine Induktion einer Parodontitis (PD) durch orale Inokulation eines typischen Bakteriums (*Porphyromonas gingivalis*) zuverlässig und reproduzierbar möglich ist. Nachfolgend sollte der Einfluss von drei verschiedenen Parodontitis-typischen Bakterien auf die Kollagen-induzierte Arthritis untersucht werden.

In diesem Zusammenhang basiert diese Studie auf drei Arbeitshypothesen. Die erste Hypothese postuliert, dass die Induktion der Parodontitis durch orale Inokulation mit *P. gingivalis* abhängig ist von der genetischen Empfänglichkeit der verwendeten Tiere. Diese Hypothese konnte bestätigt werden, da nur Mäuse der F1 (DBA/1J x B10.Q) einen signifikanten alveolaren Knochenverlust im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen zeigten. Im Gegensatz dazu konnte bei Mäusen des DBA/1J-Stammes keine Anzeichen einer Parodontitis nachgewiesen werden. Diesbezüglich erwies sich die Literatur als widersprüchlich. Maresz et. al. gaben an, dass DBA/1J-Mäuse resistent gegenüber einer oralen Inokulation mit *P. gingivalis* sind (69), während Marchesan et. al. einen signifikanten alveolaren Knochenverlust nach Inokulation mit *P. gingivalis* zeigten (82). Unsere Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von Maresz et. al., dass DBA/1J-Mäuse resistent gegenüber einer durch *P. gingivalis* ausgelösten Parodontitis sind. Bei den Versuchstieren des SKG-Stammes konnten eine nur gering ausgeprägte Parodontitis beobachtet werden. Hinzu kommt, dass bei diesen Tieren keine Spontanarthritis festgestellt werden konnte. Dies erwies sich als überraschend, da in der Literatur beschrieben ist, dass die Tiere des SKG-Stammes den TLR 2 Signalweg triggern und im Zuge dessen eine Spontanarthritis entwickeln (79,83). Interessanterweise wurde ebenfalls beschrieben, dass eine intraperitoneale Injektion von *P. gingivalis* in SKG-Mäuse eine bestehende Arthritis verschlimmert. Jedoch muss angesichts dieser kontroversen Ergebnisse in Betracht gezogen werden, dass die verschiedenen Applikationswege der Bakterien (intraperitoneale Injektion oder orale Inokulation) für die erwähnten Effekte entscheidend sein könnten (84). Der hier durchgeführte Vergleich von drei verschiedenen Mausstämmen bestätigt die derzeit gängige Auffassung, dass die Parodontitis eine multifaktorielle Erkrankung ist, für deren Entwicklung nicht nur die simple Anwesenheit von bestimmten Bakterien ausschlaggebend ist, sondern auch eine geeignete Umgebung im Sinne eines speziell fördernden Mikromilieus nötig ist. Hinzu kommt, dass zusätzlich zu den genannten Faktoren eine spezifische genetische Prädisposition einen maßgeblichen Einfluss auf die Induktion einer Parodontitis darstellt. Interessanterweise gilt ähnliches auch für die Entwicklung einer Kollagen-induzierten Arthritis. So konnte durch verschiedene Arbeiten dieser Arbeitsgruppe beobachtet werden, dass die Tiere der F1

(DBA/1 x B10.Q) empfänglicher für die Induktion einer Kollagen-induzierten Arthritis sind, als es Tiere des DBA/1J-Stammes zu sein scheinen (unveröffentlichte Daten).

Daraus leitet sich die Vermutung ab, dass Gleiches auch für die Induktion einer Parodontitis durch orale Inokulation mit Parodontitis-typischen Bakterien gilt. Diese Vermutung wird von der Beobachtung gestützt, dass die Tiere der F1 (DBA/1 x B10.Q) auch die größte Antikörperreaktion gegen *P. gingivalis* zeigten, während die Antikörpertiter bei den anderen verwendeten Mausstämmen vergleichsweise gering blieben. Auch wenn mit der durchgeführten semiquantitativen Analyse der antibakteriellen Antikörper die Tatsache nicht ausgeschlossen werden kann, dass die verschiedenen Antikörperreaktionen die einfache Antwort auf die bloße Anwesenheit verschiedener oraler Pathogene darstellt, wird hier auf Grundlage der beobachteten Ergebnisse die Auffassung bevorzugt, dass diese Antikörper in der Pathogenese der Parodontitis eine entscheidende Rolle spielen – sei es durch direkte Aktivierung des Komplementsystems oder indirekt im Sinne einer T-Helferzell Antwort.

Die zweite Hypothese auf der diese Studie beruht, vermutet, dass die orale Inokulation von drei verschiedenen Parodontitis-typischen Bakterien in Kombination, je eines aus dem grünen, orangen und roten Komplex, eine schwerwiegendere Parodontitis hervorruft, als durch Inokulation von nur einem PD-typischen Bakterium allein (54,85,86). Überraschenderweise konnte in dieser Arbeit jedoch beobachtet werden, dass der Knochenverlust bei den Tieren, die mit dem Bakterienmix behandelt wurden, geringer ausgeprägt war, als bei den Tieren, die nur mit einem einzelnen Bakterium behandelt wurden. Der direkte Vergleich dieser Ergebnisse des Bakterienmixes mit den Ergebnissen der Einzelinokulation von *P. gingivalis* (Bakterium des roten Komplexes), *F. nucleatum* (Bakterium des Brücken- oder orangen Komplexes) oder *A. actinomycetemcomitans* (Bakterium des grünen oder frühkolonisierenden Komplexes) zeigte den stärksten Knochenverlust bei den Tieren, die nur mit *P. gingivalis* allein inokuliert wurden. Diese Ergebnisse sind insgesamt unerwartet und stehen im konkreten Gegensatz zu bisher publizierten Daten, die bezogen auf den alveolaren Knochenverlust zeigen konnten, dass *F. nucleatum* und *P. gingivalis* in der Lage sind, sich synergistisch zueinander zu verhalten. Es wurde beobachtet, dass bei gleichzeitiger Behandlung von Mäusen mit *F. nucleatum* und *P. gingivalis* eine stärkere Parodontitis ausgelöst wurde, als es bei einer Behandlung mit nur einem Bakterium der Fall war (74,87,88).

Diesbezüglich kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, dass, wie bereits vermutet, der genetische Hintergrund eine noch nicht genau zu beziffernde, aber sehr wichtige Rolle spielt. Alternativ lässt sich vermuten, dass die dreitägige Washout-Phase nach initialer

Antibiotikatherapie ausreichend war, dass sich die native orale Flora wiederherstellt und infolgedessen die effektive Kolonisierung von *A. actinomycetemcomitans* (als Frühkolonisierer) und *F. nucleatum* (als Brückenkeim) behindert wird.

Es würde auch die herausragenden knochendestruierenden Effekte von appliziertem *P. gingivalis* erklären, das als Bakterium des roten Komplexes als sogenannter „late-colonizer“ gilt und von der Anwesenheit anderer Bakterien profitiert. Diese Eigenschaft könnte nach Rekonstitution der oralen nativen Flora in diesem Fall von Vorteil gewesen sein. Unterstützt wird diese Vermutung von der Tatsache, dass *in vitro* Experimente zeigen konnten, dass die Fähigkeit zur Anhaftung und Invasion *P. gingivalis* als Einzelpathogen in und an das Zahn umgebende Gewebe im Vergleich zu *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* insgesamt reduziert ist (89). Weiterhin wurde beobachtet, dass eine Coinfektion von *Fn* und *Aa* in Kombination in einer verbesserten Anhaftung und Invasion in und an das Zahn umgebende Gewebe resultiert, während dieser Effekt bei separater Applikation nur eines der genannten Bakterien deutlich geringer ausgeprägt war (90). Somit könnte die Rekonstitution der nativen Oralflora auf der einen Seite für einzeln appliziertes *P. gingivalis* von Vorteil gewesen sein und die herausragenden Effekte auf den Alveolarknochen erklären. Auf der anderen Seite könnte die Wiederherstellung der nativen Flora für die Anhaftung von *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* von Nachteil gewesen sein. Dies ist beispielsweise durch anderen Bakterien der genannten Komplexe möglich, die dann verdrängend auf die Anhaftung und das Wachstum von *Fn* und *Aa* gewirkt haben. Dies würde zumindest die überraschend geringen Effekte der beiden Bakterien auf das Parodontium erklären. Zu Klärung dieser Vermutung könnte eine Analyse des oralen Mikrobioms direkt nach Ende der antibiotischen Therapie in der frühen Experimentphase hilfreich sein, bei der eine mögliche Rekonstitution der nativen oralen Flora nachvollzogen werden könnte.

Die wohl bedeutendste und zugleich schwer verständlichste Beobachtung dieser Arbeit ist die Tatsache, dass die orale Inokulation mit dem Bakterienmix, bestehend aus *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, einen signifikant geringeren alveolaren Knochenverlust hervorgerufen hat, als es bei der alleinigen Inokulation mit *P. gingivalis* der Fall war. Diese Beobachtung spricht, angesichts der hier beobachteten fehlenden Gruppenunterschiede der antibakteriellen Antikörpertiter nicht nur gegen die Vermutung, dass es zu einem Verdrängenden Wachstum eines Bakteriums und überschießendem Wachstum eines anderen Bakteriums gekommen ist, sondern es legt die Vermutung nahe, dass die

Anwesenheit von *F. nucleatum* und *A. actinomycetemcomitans* einen möglichen protektiven Effekt hinsichtlich des alveolären Knochenabbaus bedingen.

Unterstützt wird diese Beobachtung von Daten, die gezeigt haben, dass die orale Koinfektion mit *P. gingivalis* und *F. nucleatum* modulierend auf die Immunantwort wirkt, im Sinne eines Antikörpersubklassen-Wechsels bei der Produktion der antibakteriellen Antikörpern, als es bei alleiniger Inokulation von *P. gingivalis* der Fall war (80). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass verschiedene Stämme von *P. gingivalis* in der Lage sind, jeweils verschiedene Zytokinantworten hervorzurufen (91). In unserer Studie konnten jedoch weder gruppenspezifische Unterschiede in Seren von Tieren, die mit dem Bakterienmix behandelt wurden, beobachtet werden, noch wurden Unterschiede in Seren von Tieren gefunden, die mit einzelnen Bakterien behandelt wurden. Es wurde jedoch keine detaillierte Untersuchung der Antikörper-Subklassen durchgeführt, sodass Aussagen über einen möglichen Antikörpersubklassen-Wechsels nicht zu tätigen sind. Dies könnte Ziel weiterer Experimente in Zukunft sein, die dann die spezifischen Immunmechanismen angesichts verschiedener Bakterien näher beleuchten könnten.

Die dritte Hypothese dieser Arbeit postuliert die Vermutung, dass eine vorbestehende Parodontitis eine nachfolgend ausgelöste Kollagen-induzierte Arthritis in ihrer Manifestation verschlimmert. Einige Studien in der Vergangenheit konnten dies bereits bestätigen. Als wegweisend erwiesen sich hier die Studien von Cantley et. al (68), Marchesan et. al (82) und Park et. al (92), die bereits zwischen 2011 und 2013 festgestellt haben, dass sich die symptomatische Ausprägung einer Kollagen-induzierten Arthritis durch Applikation von Parodontitis-typischen Bakterien verstärken ließen. In diesem Experiment wurde die symptomatische Ausprägung der experimentellen Arthritis zweifach evaluiert. Zum einen erfolgte die individuelle Überwachung von arthritischen Symptomen anhand eines makroskopischen Scores am Ende der experimentellen Phase. Hierbei konnten keine Unterschiede zu sham-behandelten Tieren beobachtet werden. Zum anderen erfolgte die Evaluierung der Inzidenz der Arthritis über den Zeitraum des Experiments. Interessanterweise wurde hierbei festgestellt, dass der steilste Anstieg der Inzidenz bei den Tieren aufgetreten ist, die entweder mit *F. nucleatum* oder *A. actinomycetemcomitans* behandelt wurden, obwohl deren parodontitische Symptome insgesamt nur gering ausgeprägt waren. Im Gegensatz dazu zeigten die Versuchstieren, die den größten alveolaren Knochenverlust aufwiesen, einen Anstieg der Arthritisinzidenz, der mit sham-behandelten Tieren vergleichbar ist. Überraschenderweise wurde bei den Mäusen, die mit dem Bakterienmix aus *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* behandelt wurden, nur eine mild ausgeprägte

Parodontitis beobachtet, während sie gleichzeitig auch den langsamsten Anstieg der Arthritisinzidenz zeigten. Dies lässt, wie bereits erwähnt, einen protektiven oder verlangsamenden Effekt des Bakterienmixes vermuten.

Mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit sind die beobachteten Effekte nicht erklärbar. Es lässt sich daher nur darüber spekulieren, ob schlussendlich eine induzierte Parodontitis oder der alveoläre Knochenverlust *per se* die modulierenden Effekte auf die nachfolgend induzierte Arthritis hervorruft. Vielmehr muss in Betracht gezogen werden, dass die oral applizierten Bakterien einen systemisch-modulierenden Effekt auf das Immunsystem ausgelöst haben, der letztendlich zu einem veränderten Zytokinmilieu führt, das entweder protektiv oder unterstützend auf eine nachfolgende Arthritis wirkt. Diese Hypothese wird von kürzlich durchgeführten Studien unterstützt, die zeigen konnte, dass oral angesiedelte Bakterien einen modulierenden Effekt auf das Mikrobiom des Gastrointestinaltraktes und auf die systemische Zytokinproduktion haben (93,94).

Zwar ist bekannt, dass sowohl die Kollagen-induzierte Arthritis, als auch die Parodontitis abhängig von einer Th17 dominierten Immunantwort sind, insgesamt bleiben die exakten immunologischen Mechanismen, die durch die verschiedenen oralen Bakterien ausgelöst werden, aber bis heute unbekannt (95). Leider zeigte die in dieser Studie durchgeführte Analyse von Inflammationsmarkern im Serum am Ende der experimentellen Phase keine spezifischen Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass auch hier über einen modulierenden Effekt der Bakterien nur spekuliert werden kann. Gleichzeitig konnten am Ende der Experimentphase auch keine Unterschiede bezüglich der spezifischen Antikörper gegen die verschiedenen Kollagene Typ II (anti-murine und anti-bovine) oder zyklischen citrullinierten Peptide (anti-CCP) gemessen werden.

Die Aussagekraft dieser Studie ist daher limitiert. Die größte Schwäche dieser durchgeführten Arbeit liegt in der begrenzten Beobachtungsphase und die nur einmalig durchgeführte Analyse des Serums. Insgesamt scheinen mehrere Serumanalysen zu früheren Zeitpunkten im Verlauf des Experimentes nötig, um die unterschiedlichen Immunantworten, die durch die verschiedenen applizierten Bakterien ausgelöst werden, adäquat zu evaluieren. So ist vermutlich in dieser Arbeit der Gipfel der Entzündungsreaktion in Hinblick auf Parodontitis und Arthritis durch die nur einmal durchgeführte Blutentnahme verpasst worden und die Tiere befanden sich möglicherweise bereits in Remission. Gleichzeitig erscheinen mehrere Serumanalysen zu späteren Zeitpunkten auch sinnvoll, zum Beispiel zum Zeitpunkt des Erstauftretens von arthritischen Symptomen, um in dieser Zeit

keine Bakterien-spezifischen Späteffekte während der Entwicklung der experimentellen Arthritis zu verpassen (96).

Weiterhin ist der beobachtete alveoläre Knochenverlust formal nicht auf die orale Infektion mit verschiedenen Parodontitis-typischen Bakterien zurückgeführt worden. Gleichzeitig sind keine lebendigen Bakterien aus dem umliegenden Gewebe der Zähne isoliert worden. Zwar ist durch die Analyse der antibakteriellen Serumantikörper der Kontakt mit Bakterien nachgewiesen worden, dieser Kontakt ist aber nicht zwangsläufig durch eine orale Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Bakterium bedingt, sondern könnte auch entlang des Gastrointestinaltraktes geschehen sein. Infolgedessen ist nicht auszuschließen, dass die oral applizierten Bakterien eine Entzündung im Gastrointestinaltrakt mit nachfolgender Citrullinierung ausgelöst haben, die dann über eine systemische Entzündungsreaktion einen alveolären Knochenverlust induziert haben. Es sei jedoch erwähnt, dass ein solcher Zusammenhang zwischen ACPA-Antikörpertiter und Knochenverlust anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beobachtet wurde.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie zum ersten Mal *in vivo* die Auswirkungen von drei gleichzeitig applizierten Parodontitis-typischen Bakterien (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) auf die Kollagen-induzierte Arthritis gezeigt. Obwohl die Entwicklung und symptomatische Ausprägung der Parodontitis und Arthritis nicht parallel geschah, hatten die applizierten Bakterien dennoch einen signifikanten Einfluss auf den alveolären Knochenverlust, sowie auf den Entwicklungszeitpunkt und die Progression der experimentellen Arthritis.



**VII. LITERATURVERZEICHNIS**

---

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. Elsevier Ltd; Oktober 2016;388(10055):2023–38.
2. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. Elsevier Inc.; Februar 2017;46(2):183–96.
3. Catrina AI, Svensson CI, Malmström V, Schett G, Klareskog L. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 15. Dezember 2016;13(2):79–86.
4. Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Mædica*. 2010;5(4):286–91.
5. McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. Elsevier Ltd; Juni 2017;389(10086):2328–37.
6. Sangha O. Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology*. Januar 2000;39(suppl.2):3–12.
7. Sokka T, Kautiainen H, Pincus T, Verstappen SM, Aggarwal A, Alten R, u. a. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA Study. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R42.
8. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet*. Juni 2017;389(10086):2338–48.
9. Wilske KR. Remodeling the therapeutic pyramid: Evolving therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Japanese J Rheumatol*. 1999;9(1):1–16.
10. Scott DL, Coulton BL, Symmons DPM, Popert AJ. Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet*. Mai 1987;329(8542):1108–11.
11. Kavanaugh A. Combination cytokine therapy: The next generation of rheumatoid arthritis therapy? *Arthritis Rheum*. Februar 2002;47(1):87–92.
12. Krüger K, Wollenhaupt J, Albrecht K, Alten R, Backhaus M, Baerwald C, u. a. S1-Leitlinie der DGRh zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012. *Z Rheumatol*. 30. September 2012;71(7):592–603.
13. Smolen JS, Aletaha D, Bijlsma JWJ, Breedveld FC, Boumpas D, Burmester G, u. a. Treating rheumatoid arthritis to target: recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 1. April 2010;69(4):631–7.
14. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, u. a. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. Juni 2017;76(6):960–77.

15. Monti S, Montecucco C, Bugatti S, Caporali R. Rheumatoid arthritis treatment: the earlier the better to prevent joint damage. *RMD Open*. 15. August 2015;1(Suppl 1):e000057.
16. Silman AJ, Newman J, Macgregor AJ. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis: Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum*. Mai 1996;39(5):732–5.
17. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, u. a. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 1. Januar 2010;69(1):70–81.
18. Chang K, Yang S, Kim S, Han K, Park S, Shin J. Smoking and Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 3. Dezember 2014;15(12):22279–95.
19. Klareskog L, Malmström V, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol*. Elsevier Ltd; April 2011;23(2):92–8.
20. Sparks JA, Chen C-Y, Hiraki LT, Malspeis S, Costenbader KH, Karlson EW. Contributions of Familial Rheumatoid Arthritis or Lupus and Environmental Factors to Risk of Rheumatoid Arthritis in Women: A Prospective Cohort Study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. Oktober 2014;66(10):1438–46.
21. Lu B, Hiraki LT, Sparks JA, Malspeis S, Chen C-Y, Awosogba JA, u. a. Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. *Ann Rheum Dis*. November 2014;73(11):1914–22.
22. Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander. *Autoimmun Rev*. Elsevier B.V.; 2014;13(9):981–1000.
23. Humphreys JH, Verstappen SMM, Hyrich KL, Chipping JR, Marshall T, Symmons DPM. The incidence of rheumatoid arthritis in the UK: comparisons using the 2010 ACR/EULAR classification criteria and the 1987 ACR classification criteria. Results from the Norfolk Arthritis Register. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(8):1315–20.
24. Oliver JE, Silman AJ. Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 12. Januar 2006;35(3):169–74.
25. Jiang X, Frisell T, Askling J, Karlson EW, Klareskog L, Alfredsson L, u. a. To What Extent Is the Familial Risk of Rheumatoid Arthritis Explained by Established Rheumatoid Arthritis Risk Factors? *Arthritis Rheumatol*. Februar 2015;67(2):352–62.
26. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, u. a. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol*. England; Oktober 1993;32(10):903–7.

27. Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 5. Oktober 2013;45(2):170–9.
28. De Almeida DE, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*; 2011;585(23):3619–26.
29. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA–DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol*. Mai 2010;22(3):293–8.
30. Salemi S, Biondo MI, Fiorentino C, Argento G, Paolantonio M, Di Murro C, u. a. Could Early Rheumatoid Arthritis Resolve After Periodontitis Treatment Only? *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(27):e195.
31. de Smit MJ, Westra J, Brouwer E, Janssen KMJ, Vissink A, van Winkelhoff AJ, u. a. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: What do we Know? *J Periodontol*. 2015;93(27):1–10.
32. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2010;6(12):727–30.
33. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 24. August 2017;13(10):606–20.
34. Persson GR. Rheumatoid arthritis and periodontitis – inflammatory and infectious connections. Review of the literature. *J Oral Microbiol*. 13. Januar 2012;4(1):11829.
35. Payne JB, Golub LM, Thiele GM, Mikuls TR. The Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: A Periodontist's Perspective. *Curr Oral Heal Reports*. 24. März 2015;2(1):20–9.
36. de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol*. 1. Januar 2008;35(1):70 LP-76.
37. Käßer UR, Michel A, Bolten WW, Gleissner C, Dehne F, Willershausen-Zönnchen B. Risk for periodontal disease in patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. Dezember 1997;40(12):2248–51.
38. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2014;15(1):30–44.
39. Armitage GC, Cullinan MP. Comparison of the clinical features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. Juni 2010;53(1):12–27.

40. Holtfreter B, Kocher T, Hoffmann T, Desvarieux M, Micheelis W. Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey (DMS IV). *J Clin Periodontol*. 2010;37(3):211–9.
41. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. Februar 2014;64(1):57–80.
42. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. Februar 1998;25(2):134–44.
43. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*. Juni 1994;5(1):7–25.
44. Haffajee a D, Cugini M a, Tanner a, Pollack RP, Smith C, Kent RL, u. a. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol*. 1998;25(5):346–53.
45. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27(6):409–19.
46. Deng Z-L, Szafranski SP, Jarek M, Bhuju S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep*. 16. Dezember 2017;7(1):3703.
47. Meuric V, Le Gall-David S, Boyer E, Acuña-Amador L, Martin B, Fong SB, u. a. Signature of Microbial Dysbiosis in Periodontitis. McBain AJ, Herausgeber. *Appl Environ Microbiol*. 15. Juli 2017;83(14):e00462-17.
48. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis M a. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. Nature Publishing Group; 3. September 2012;10(10):717–25.
49. Ohlrich E, Cullinan M, Seymour G. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*. September 2009;54:S2–10.
50. Henderson B, Ward JM RD. *Aggregatibacter* ( *Actinobacillus* ) *actinomycetemcomitans*: a triple A \* periodontopathogen? *Periodontol 2000*. 2010;54:78–105.
51. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafil HS. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog*. 2017;113(November):303–11.
52. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Velliyagounder K. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as an Early Colonizer of Oral Tissues: Epithelium as a Reservoir? *J Clin Microbiol*. Dezember 2010;48(12):4464–73.
53. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. Elsevier Ltd; 2015;23:141–7.

54. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev. Januar 1996;9(1):55–71.
55. How KY, Song KP, Chan KG. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. Front Microbiol. 9. Februar 2016;7(FEB):1–14.
56. McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Sequence Analysis of a Potential Virulence Factor from Porphyromonas gingivalis , Peptidylarginine Deiminase Purification , Characterization , and Sequence Analysis of a Potential Virulence Factor from Porphyromonas gingivalis , Peptidylarginine Deiminase. Infect Immun. 1999;67(7):3248–56.
57. Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. Curr Rheumatol Rep. 2014;16(3):408.
58. Pruijn GJM. Citrullination and Carbamylation in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis. Front Immunol. 27. April 2015;6(APR):1–5.
59. Baka Z, György B, Géher P, Buzás EI, Falus A, Nagy G. Citrullination under physiological and pathological conditions. Jt Bone Spine. Oktober 2012;79(5):431–6.
60. Puszczewicz M, Iwaszkiewicz C. Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. Arch Med Sci. 2011;2(2):189–94.
61. Vander Cruyssen B, Peene I, Cantaert T, Hoffman IEA, De Rycke L, Veys EM, u. a. Anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPA) in rheumatoid arthritis: Specificity and relation with rheumatoid factor. Autoimmun Rev. 2005;4(7):468–74.
62. Sakkas LI, Daoussis D, Liossis S-N, Bogdanos DP. The Infectious Basis of ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis. Front Microbiol. 27. September 2017;8(SEP):1–9.
63. Koga T, Okada A, Fukuda T, Hidaka T, Ishii T, Ueki Y, u. a. Anti-citrullinated peptide antibodies are the strongest predictor of clinically relevant radiographic progression in rheumatoid arthritis patients achieving remission or low disease activity: A post hoc analysis of a nationwide cohort in Japan. PLoS One. 2017;12(5):1–13.
64. Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K-A, Lundberg K, u. a. Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. September 2010;62(9):2662–72.
65. Koushik S, Joshi N, Nagaraju S, Mahmood S, Mudeenahally K, Padmavathy R, u. a. PAD4: pathophysiology, current therapeutics and future perspective in rheumatoid arthritis. Expert Opin Ther Targets. Taylor & Francis; 3. April 2017;21(4):433–47.
66. Pratesi F, Petit Teixeira E, Sidney J, Michou L, Puxeddu I, Sette A, u. a. HLA shared epitope and ACPA: Just a marker or an active player? Autoimmun Rev. Elsevier B.V.; Oktober 2013;12(12):1182–7.

67. Lundberg K, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, u. a. Antibodies to citrullinated  $\alpha$ -enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* Oktober 2008;58(10):3009–19.
68. Cantley MD, Haynes DR, Marino V, Bartold PM. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J Clin Periodontol.* Juni 2011;38(6):532–41.
69. Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, Koziel J, u. a. *Porphyromonas gingivalis* Facilitates the Development and Progression of Destructive Arthritis through Its Unique Bacterial Peptidylarginine Deiminase (PAD). Kazmierczak BI, Herausgeber. *PLoS Pathog.* 12. September 2013;9(9):e1003627.
70. Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, u. a. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *J Periodontal Res.* 2016;51(5):639–46.
71. Hiyari S, Wong RL, Yaghseizian A, Naghibi A, Tetradis S, Camargo PM, u. a. Ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in mice. *J Clin Periodontol.* 17. November 2017;(September 2017):89–99.
72. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods.* Elsevier B.V.; August 2013;394(1–2):49–54.
73. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, u. a. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. *J Periodontol.* März 2014;85(3):465–77.
74. Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI, u. a. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* / *Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *J Clin Periodontol.* Mai 2009;36(5):406–10.
75. Oliver-Bell J, Butcher JP, Malcolm J, MacLeod MKL, Adrados Planell A, Campbell L, u. a. Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody. *Mol Oral Microbiol.* 12. September 2014;1–10.
76. Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-Induced Arthritis as an Animal Model for Rheumatoid Arthritis: Focus on Interferon- $\gamma$ . *J Interf Cytokine Res.* Dezember 2011;31(12):917–26.
77. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* Mai 2007;2(5):1269–75.
78. Lu, M; Kotelchuck, M; Hogan, V; Jones, L; Wright K, Halfon N. Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis. *Ethn Dis.* 2010;20(1 Supplement):1–26.

79. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, u. a. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 27. November 2003;426(6965):454–60.
80. Gemmell E, Bird PS, Ford PJ, Ashman RB, Gosling P, Hu Y, u. a. Modulation of the antibody response by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*. August 2004;19(4):247–51.
81. Engelmann R, Müller-Hilke B. Experimental silicosis does not aggravate collagen-induced arthritis in mice. *J Negat Results Biomed. Journal of Negative Results in BioMedicine*; 13. Dezember 2017;16(1):5.
82. Marchesan JT, Gerow EA, Schaff R, Taut AD, Shin S-Y, Sugai J, u. a. *Porphyromonas gingivalis* oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. Januar 2013;15(6):R186.
83. Gibson III F, Genco C. *Porphyromonas gingivalis* Mediated Periodontal Disease and Atherosclerosis: Disparate Diseases with Commonalities in Pathogenesis Through TLRs. *Curr Pharm Des*. 1. Dezember 2007;13(36):3665–75.
84. Metzger Z, Lin Y-Y, Dimeo F, Ambrose WW, Trope M, Arnold RR. Synergistic Pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in the Mouse Subcutaneous Chamber Model. *J Endod. American Association of Endodontists*; Januar 2009;35(1):86–94.
85. Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The Biofilm Community: Rebels with a Cause. *Curr Oral Heal Reports*. 7. März 2015;2(1):48–56.
86. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. Juni 2008;23(3):196–205.
87. Yamakawa M, Ouhara K, Kajiya M, Munenaga S, Kittaka M, Yamasaki S, u. a. *Porphyromonas gingivalis* infection exacerbates the onset of rheumatoid arthritis in SKG mice. *Clin Exp Immunol*. November 2016;186(2):177–89.
88. Zubery Y, Dunstan CR, Story BM, Kesavalu L, Ebersole JL, Holt SC, u. a. Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin. *Infect Immun*. September 1998;66(9):4158–62.
89. Kriebel K, Biedermann A, Kreikemeyer B, Lang H. Anaerobic Co-Culture of Mesenchymal Stem Cells and Anaerobic Pathogens - A New In Vitro Model System. Mezey E, Herausgeber. *PLoS One*. 4. November 2013;8(11):e78226.
90. Li Y, Guo H, Wang X, Lu Y, Yang C, Yang P. Coinfection with *Fusobacterium nucleatum* can enhance the attachment and invasion of *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to human gingival epithelial cells. *Arch Oral Biol. Elsevier Ltd*; September 2015;60(9):1387–93.

91. Marchesan JT, Morelli T, Lundy SK, Jiao Y, Lim S, Inohara N, u. a. Divergence of the systemic immune response following oral infection with distinct strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol*. Dezember 2012;27(6):483–95.
92. Park J-C, Su C, Jung I-H, Choi S-H, Cho K-S, Kim C-K, u. a. Mechanism of alveolar bone loss in a collagen-induced arthritis model in mice. *J Clin Periodontol*. Februar 2011;38(2):122–30.
93. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, u. a. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*. 6. Mai 2015;4(1):4828.
94. Miyauchi S, Maekawa T, Aoki Y, Miyazawa H, Tabeta K, Nakajima T, u. a. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoEshl mice. *J Periodontal Res*. Juni 2012;47(3):402–8.
95. Toh M-L, Miossec P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(3):284–8.
96. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol*. 2003;25(1):3–18.



**VIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

---

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock, den 14.10.2018

Meinolf N.B. Ebbers

---

**IX. LEBENSLAUF**


---

**Persönliche Daten**


---

Name:	Meinolf Nikolas Bernhard Ebbers
Geburtsdatum / Geburtsort:	01.06.1988 in Nordhorn
Anschrift:	Neubramowstraße 18, 18057 Rostock
E-Mail:	meinolf.ebbers@googlemail.de

**Bildungsweg**


---

01.12.2017	Approbation als Arzt
10/2013 – 12/2017	Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt Universität Rostock
04/2010 – 03/2012	Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt Georg-August-Universität Göttingen (Teilstudienplatz)
08/2007 – 03/2010	Zivildienst mit integrierter Ausbildung zum Rettungsassistent Rettungsdienst DRK-Kreisverband Grafschaft Bentheim e.V.
08/2000 – 07/2007	Gymnasium Nordhorn Abitur

**Promotion**


---

05/2014 – heute	Einfluss einer durch <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> und <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ausgelösten Parodontitis auf die Kollagen-induzierte Arthritis AG klinische Immunologie, Prof. Dr. B. Müller-Hilke, MME Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock
-----------------	--

**Praktisches Jahr**


---

07/2017 – 10/2017	Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie Universitätsmedizin Rostock Direktor: Prof. Dr. D. A. Reuter
03/2017 – 07/2017	Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten Zentrum für Innere Medizin, Universitätsmedizin Rostock Direktor: Prof. Dr. E. C. Reisinger, MBA
01/2017 – 03/2017	Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Universitätsmedizin Rostock Direktor: Prof. Dr. T. Mittlmeier
11/2016 – 01/2017	Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie Universitätsmedizin Rostock Direktor: Prof. Dr. E. Klar

**Berufliche Erfahrung**


---

04/2014 – 2/2017	Dozent und Tutor Skillslab, Universitätsmedizin Rostock Leitung: Dr. G. Rücker
10/2015 – 12/2015	studentische Hilfskraft Gemeinschaftspraxis Dres. med. Lepère & Ludwig, Rostock
08/2007 – 12/2014	Rettungsassistent Rettungsdienst DRK-KV Grafschaft Bentheim e.V.

---

## Publikationen

---

**Ebbers M**, Lübcke PM, Volzke J, Kriebel K, Hieke C, Engelmann R, et al. Interplay between *P. gingivalis*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* in murine alveolar bone loss, arthritis onset and progression. *Sci Rep*. 2018 Dec 11;8(1):15129.

Pongratz P, **Ebbers M**, Geerdes-Fenge H, Reisinger EC. RE: '*Streptococcus pluranimalium* : A novel human pathogen?'. *Int J Surg Case Rep. Surgical Associates Ltd*; 2017;41:493–4.

Meinolf N. B. Ebbers  
Rostock, den 14.10.2018

<b>X.      TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>SEITE</b>
Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterien	20
Tabelle 2: Scoring zur Quantifizierung der Kollagen-induzierten Arthritis	23
Tabelle 3: Übersicht über die gewählten Einstellungen der Scan-Software 1076 Control	24
Tabelle 4: Übersicht über die gewählten Einstellungen der Scan-Software NRecon	24
Tabelle 5: Protokoll zur Knochenentkalkung	25
Tabelle 6: Protokoll der HE-Färbung	26
Tabelle 7: Übersicht über die Versuchsgruppen im Vorexperiment	29
Tabelle 8: Einteilung der Gruppen im Hauptexperiment	30
Tabelle 9: Übersicht über die gemessenen inflammatorischen Marker im Serum	51

<b>XI.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>SEITE</b>
Abbildung 1:	Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Experimente.	31
Abbildung 2:	Es mussten Dosisanpassungen vorgenommen werden.	32
Abbildung 3:	Digitale Ausrichtung der $\mu$ CT-Bilder der rechten Hemimandibula im dreidimensionalen Raum im CTAnalyzer.	34
Abbildung 4:	Übersicht von oben auf die 18 Messpunkte entlang der drei Molaren des rechten Unterkiefers.	35
Abbildung 5:	Ablauf und Vermessung der Zahnlänge und Einteilung der Strecken zur Positionierung der Messpunkte.	36
Abbildung 6:	Vermessung eines Zahns des rechten Unterkiefers an einem vorher festgelegten Messpunkt.	37
Abbildung 7:	Mäuse der F1 (DBA/1J x B10.Q) zeigten den stärksten Knochenverlust nach 8 oralen Inokulationen mit <i>P. gingivalis</i> .	38
Abbildung 8:	Versuchstiere der F1 (DBA/1J x B10.Q) zeigten die höchsten IgG Serumantikörpertiter gegen <i>P. gingivalis</i> .	39
Abbildung 9:	Mäuse, die mit <i>P. gingivalis</i> alleine inokuliert wurden, zeigten den stärksten Knochenverlust aller behandelten Gruppen.	40
Abbildung 10:	Exemplarische Darstellung von symptomatischen und asymptomatischen Extremitäten der Mäuse im Verlauf der Kollagen-induzierten Arthritis.	42
Abbildung 11:	Keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der makroskopisch evaluierten symptomatischen Schwere der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) an Tag 85.	42
Abbildung 12:	Tiere, die mit <i>F. nucleatum</i> oder <i>A. actinomycetemcomitans</i> inokuliert wurden, zeigten den schnellsten Anstieg der Inzidenz.	43
Abbildung 13:	Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der relativen Körpergewichtszunahme im Verlauf des Hauptexperimentes.	44
Abbildung 14:	Exemplarische Darstellung der histologischen Untersuchung der Hinterläufe	46
Abbildung 15:	Alle Versuchstiergruppen, die mit Bakterien inokuliert wurden, zeigten erhöhte antibakterielle Antikörpertiter	47
Abbildung 16:	Alle Versuchstiergruppen zeigten am Ende des Experiments vergleichbare Serumantikörpertiter gegen bovines Kollagen Typ II.	49
Abbildung 17:	Alle Versuchstiergruppen zeigten vergleichbare Serumantikörpertiter gegen murines Kollagen Typ II	50
Abbildung 18:	Alle Versuchsgruppen zeigten am Ende des Beobachtungszeitraumes vergleichbare Zytokinspiegel	52
Abbildung 19:	Alle Versuchsgruppen zeigten am Ende der Beobachtungsphase vergleichbare Antikörpertiter gegen zyklische citrullinierte Proteine (anti-CCP).	53

## XII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
° C	Grad Celsius
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Abb	Abbildung
ABC	Kamm des Alveolarknochens ( <i>engl.</i> alveolar bone crest)
ACPA	Antikörper gegen cyklische citrullinierte Peptide ( <i>engl.</i> anti citrullinated peptide antibodies)
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>engl.</i> analysis of variance)
Anti-CCP	Antikörper gegen zyklische citrullinierte Peptid ( <i>engl.</i> anti citrullinated peptide antibodies)
ATCC	American Type Culture Collection
B10.Q	Mausstamm ( <i>engl.</i> Black 10)
BHI	Brain Heart Infusion Medium
BSA	bovines Serumalbumin
CCP	zyklische citrullinierte Peptid ( <i>engl.</i> Cyclic Citrullinated Peptide)
CEJ	Übergang Zahnzement zum Zahnschmelz ( <i>engl.</i> cemento-enamel junction)
CFA	Komplettes Freuds-Adjuvanz ( <i>engl.</i> Complete Freud's Adjuvant)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis ( <i>engl.</i> collagen-induced arthritis)
CMC	Carboxymethylcellulose
DBA/1J	Mausstamm ( <i>engl.</i> Dilute Brown Non-Agouti)
DMARDS	spezielle Immunsuppressiva in der Therapie der RA ( <i>engl.</i> Disease-modifying anti-rheumatic drugs)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F1 (DBA/1J x B10.Q)	F1 Generation mit je einem Elterntier des DBA/1J- und B10.Q-Stammes
<i>Fn</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor ( <i>engl.</i> Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HLA	Histokompatibilitätsantigen ( <i>engl.</i> Human Leukocyte Antigene)
IFA	Inkomplettes Freuds-Adjuvanz ( <i>engl.</i> Incomplete Freud's Adjuvant)

---

IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
KBE	Koloniebildenden Einheiten
kV	Kilovolt
Log <sub>10</sub>	Dekadischer Logarithmus
M	Molar
MCP	CC-Chemokin-Ligand-2 ( <i>engl.</i> Monocyte Chemoattractant Protein-1)
MCV	mutiertes citrulliniertes Vimentin
mg	Milligramm
Mi	Bakterienmix bestehend aus <i>Fn</i> , <i>Aa</i> und <i>Pg</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
N	Anzahl ( <i>engl.</i> Number)
NaCl	Natriumchlorid
Nm	Nanometer
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert ( <i>engl.</i> probability)
PAD	Peptidylarginine Deiminase, Enzym des Bakteriums <i>P. gingivalis</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>engl.</i> Phosphate-buffered saline)
PD	Parodontitis
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pg	Picogramm
PYG	Peptone Yeast Extract Glucose Broth Medium
PZN	Pharmazentralnummer
RA	Rheumatoide Arthritis
REF	Artikelnummer als Referenz
REF	Artikelnummer als Referenz
RF	Rheumafaktoren
ROI	Region Of Interest
rpm	Drehzahl ( <i>engl.</i> rounds per minutes)
s	Sekunden
Sa	nicht mutiertes Vimentin
Sham	Scheinbehandlung von Tieren, dienen als Kontrolle
SKG	Mausstamm, benannt nach dem Entdecker Shimon Sakaguchi

---

TBS/T	Tris gepufferte Salzlösung / Tween-20 ( <i>engl.</i> Tris buffered Saline)
TNF	Tumornekrosefaktor
µA	Microampere
µCT	Micro-Computertomograph
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

---



**XIII. THESEN**

---

1. Orale Inokulationen mit *Porphyromonas gingivalis* bei Mäusen führen zu einer Parodontitis.
2. Die Empfänglichkeit eine Parodontitis zu entwickeln, hängt vom genetischen Hintergrund der Versuchstiere ab.
3. Mäuse des SKG-Stammes entwickeln keine Parodontitis nach oralen Inokulationen mit *P. gingivalis*.
4. Orale Inokulationen mit drei Parodontitis-typischen Bakterien in Kombination führen zu einer schlimmeren Parodontitis, als Inokulationen mit einem einzelnen Bakterium.
5. Eine durch drei Parodontitis-typische Bakterien ausgelöste Parodontitis führt zu verdrängendem Wachstum eines Bakteriums und konsekutiv zu eingeschränktem Wachstum eines anderen Bakteriums.
6. Die Höhe der antibakteriellen Antikörpertiter gegen *P. gingivalis* ist abhängig vom genetischen Hintergrund der Versuchstiere.
7. Orale Inokulationen bei Tieren des SKG-Stammes mit *P. gingivalis* führen zur Entwicklung einer Spontanarthritis.
8. Eine Parodontitis verschlimmert eine nachfolgend ausgelöste Kollagen-induzierte Arthritis im Vergleich zu sham-behandelten Tieren
9. Eine Parodontitis, ausgelöst durch Inokulationen von drei Parodontitis-typischen Bakterien in Kombination, führt zu einer Verschlimmerung der Kollagen-induzierten Arthritis, als nur die Applikation eines Bakteriums.
10. Die kombinierten Inokulationen mit drei Parodontitis-typischen Bakterien führen zu unterschiedlichen antibakteriellen Serumantikörpertitern verglichen mit Inokulationen mit nur einem Bakterium.

#### **XIV. DANKSAGUNG**

---

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachstehenden Personen entgegen bringen:

Besonders danken möchte ich Frau Professor Dr. Müller-Hilke, MME für die Chance und die Unterstützung zur Bearbeitung dieser Dissertation. Ich durfte sehr viel lernen und bin dafür sehr dankbar.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. B. Kreikemeyer und Herrn Prof. Dr. H. Lang für die Unterstützung bedanken.

Danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. A. Scheffold für die Begutachtung dieser Schrift.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. R. Engelmann, J. Volzke, Dr. K. Kriebel, Dr. C. Hieke und Dr. A. Osterberg für die Betreuung und Hilfe.

Auch bei P. Lübcke, M. Dettmer, D. Frenz und M. Hecker möchte ich mich herzlich für den technischen Support bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin bedanken, die trotz kurzzeitiger launischer Ausfälle während der Erstellung dieser Dissertationsschrift mir stets eine Stütze waren.